

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022591 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/47, C12N 15/12, A61K 38/17, G01N 21/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009892
- (22) Internationales Anmeldedatum:
5. September 2003 (05.09.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 44 072.7 6. September 2002 (06.09.2002) DE
103 06 085.5 7. Februar 2003 (07.02.2003) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): FORSCHUNGSVERBUND BERLIN E. V. [DE/DE]; Rudower Chaussee 17, 12489 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KLUSSMANN, Enno [DE/DE]; Parallelstr. 14B, 12209 Berlin (DE). OKSCHE, Alexander [DE/DE]; Amalienstr. 9, 12247 Berlin (DE). ROSENTHAL, Walter [DE/DE]; Machnower Busch 7, 14532 Kleinmachnow (DE).
- (74) Anwälte: RASCH, Dorit, R. usw.; PATENTANWÄLTE GULDE HENGELHAUPT ZIEBIG & SCHNEIDER, SCHÜTZENSTRASSE 15 - 17, 10117 BERLIN (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: AKAP18 DELTA, A NOVEL SPLICING VARIANT OF A PROTEIN KINASE A ANCHOR PROTEIN AND THE USE OF THE SAME

(54) Bezeichnung: AKAP18 DELTA, EINE NEUE SPLEISSVARIANTE EINES PROTEINKINASE A-ANKERPROTEINS UND VERWENDUNG DIESER

AKAP18δ

A
Aminosäuresequenz

MERPAAGEIDANKCDHLRGEETGDLTSFV

GSLADLPFAVDIQDDCGLPDVPQGNVPQGNPKRSKENRGDRNDHVKRKR
KAKDYQPNYFLSTPITNKKITAGIKVLQNSILRQDNRLTKAMVGDGSEFH
ITLLVMQLLNDEVNIGTDALLELKPVEEILEGKHLTLFPHGIGTFOQQ
VGFLKADGDHVSALLEIAETAKRTFOEKGILAGESRTFKPHLTFMKLSK
APMLWKKGVRRKEBPGLYEQFIDHRFGEIILYQIDLCMLKKQKSNYYHC
ESSIVIGEDRKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQYLBETQNKQKQGE
GNSVKAEBGDRNGDGSNNRK

B
Nukleotidsequenz

ATGGAGCGCCCCCGCGGGGAGAAATAGATGCCAATAAGTGTGA
TCATTATCAAGAGGAGAGGAGGACGGGGGACCTGGAGACGACCCCTG
TAGGTCTCTGGCAGACCTGCCCTTTGCTGCCGTAGACATTCAAGATGAC
TGTGGACTCCCTGATGTACCTCAAGGAAATGTACCTCAAGGAAACCCAAA
GAGAAGCAAAGAAATAGAGGCGACAGGAATGATCACGTGAAGAAGAGGA
AGAAGGCCAAGAAAGATTATCAACCCCACTATTCTGTCATTCCAATC
ACCAACAAAAGATTACAGCTGGAATATAAGTCTTGCAAAATTCGATACT
GAGACAGGATAATCGATTGACCAAGCCATGGTCGGGACGCGCTCTCTTC
ACATCACCTTGCTAGTGTGACGCTATTAAACGAAGATGAAGTAACATA
GOTACCGACGCGCTTTTGGAAGTGAAGCCGCTCGTTGAGAGGATCCTTGA
GGGGAAGCATCTGACTTTGCCCTTCCACGGGATTTGGCACTTCCAAGGTC
AGGTGGCTTTGTGAAGCTGGCAGACGGAGATCACGTCACTGCCCTCCTG
GAGATAGCAGAGACTGCAAAAGGACATTTAGGAAAGGACATCCTGGC
TGGAGAAAGCAGAACTTTAAGCCTCACCTGACCTTTATGAAGCTGTCCA
AAGCAACATGCTCTGGAAGAAGGAGTGAGAAATAGAGCCTGGATTG
TATGAGCAATTTATCGACCAAGATTGGAGAAAGAAATAGTACCAAT
AGATCTCTGCTCCATGCTGAAGAAACACAGCAATGTTATTACCACT
GCGAGCTTCGATCGTGATCGGTGAGAGGACCGAAAGGAGCCTGAGGAT
GCTGAAGCTGGTCAGGCTCAGTAAGAGGCTGGTGAGAAAGCCGCTGCTCAA
GGCTGTCCAGCAGTACCTAGAAGAGACACAGAAACAAAAGCAGCGGGGG
AGGGGAACCTCCGTCAAAGCTGAGGAGGAGATCGGAATGGCGATGCGAGT
GATAACAACCGGAAGTGA

A... AMINO ACID SEQUENCE
B... NUCLEOTIDE SEQUENCE

(57) Abstract: The invention relates to a nucleic acid sequence coding for a protein kinase A anchor protein, to the use of said nucleic acid sequence in a fusion protein, to a method for determining the interaction of the protein kinase A anchor protein with regulatory sub-units of the protein kinase A, and to a method for identifying cell-permeable substances.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine für ein Proteinkinase A-Ankerprotein kodierende Nukleinsäuresequenz, eine Verwendung dieser Nukleinsäuresequenz in einem Fusionsprotein und ein Verfahren zur Bestimmung der Wechselwirkung des Proteinkinase A-Ankerproteins mit regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A sowie ein Verfahren zur Identifikation zellpermeabler Substanzen.



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,

PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

AKAP18 DELTA, EINE NEUE SPLEISSVARIANTE EINES PROTEINKINASE A-ANKERPROTEINS UND VERWENDUNG DIESER

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine für ein Proteinkinase A-Ankerprotein kodierende Nukleinsäuresequenz, eine Verwendung dieser Nukleinsäuresequenz in einem Fusionsprotein und ein Verfahren zur Bestimmung der Wechselwirkung des Proteinkinase A-Ankerproteins mit regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A sowie ein Verfahren zur Identifikation zellpermeabler Substanzen.

Die biologische Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern wird über die Aktivierung von Signalkaskaden, welche den Phosphorylierungsstatus von Effektorproteinen verändern, vermittelt. An diesem reversiblen Prozess sind zwei Klassen von Enzymen beteiligt: Proteinkinasen und Phosphoproteinphosphatasen. Die Phosphorylierung erfolgt durch Kinasen, welche die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf spezifische Serin- oder Threoninreste katalysieren, die Dephosphorylierung wird durch Phosphoproteinphosphatasen vermittelt. Ein Mechanismus zur Kontrolle und Regulation dieser Enzymaktivitäten ist die Kompartimentierung dieser Enzyme durch die Assoziation mit Ankerproteinen, die in der Nähe ihrer Substrate lokalisiert sind. Die Proteinkinase A (PKA) ist eine der multifunktionellen Kinasen mit einer breiten Substratspezifität, welche durch die so genannten *protein kinase A anchoring*

proteins (AKAPs) an subzellulären Strukturen verankert wird.

Bei vielen wichtigen zellulären Prozessen wie Kontraktion, Sekretion, Stoffwechsel, Gentranskription, Zellwachstum und -teilung erfolgt die Weiterleitung extrazellulärer Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, das G-Protein G_s , Aktivierung einer Adenylzyklase und Bildung des *second-messenger* zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Die Effekte von cAMP werden durch die cAMP-abhängige PKA vermittelt.

Die Untereinheiten der PKA werden beim Menschen von sieben verschiedenen Genen, welche auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, kodiert. Drei Gene kodieren für die Isoformen der katalytischen Untereinheit $C\alpha$, $C\beta$ und $C\gamma$ und vier Gene für die Isoformen der regulatorischen Untereinheit $RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$ und $RII\beta$.

Die regulatorischen Untereinheiten zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während $RI\alpha$ und $RII\alpha$ ubiquitär in den Geweben vorkommen, ist die regulatorische Untereinheit $RI\beta$ in erster Linie im Gehirn zu finden.

Die Assoziation der RII-Untereinheiten mit intrazellulären Kompartimenten wird durch AKAPs vermittelt. Bei den Ankerproteinen handelt es sich um eine Gruppe funktionell verwandter Moleküle, die durch die Interaktion mit Typ I bzw. Typ II der regulatorischen Untereinheiten (RI bzw. RII) des PKA-Holoenzym charakterisiert sind. Die ersten Ankerproteine wurden bei der affinitätschromatographischen Reinigung der R-Untereinheiten über cAMP-Sepharose isoliert. Diese assoziierten Proteine zeigten auch nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran eine RII-Bindung. Auf dieser Beobachtung beruht auch die bisherige Methode

(RII-overlay) zur Detektion von AKAPs. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Western Blot, bei dem statt eines primären Antikörpers radioaktiv markierte RII-Untereinheiten als Sonde eingesetzt werden.

Zur funktionellen Bedeutung der RI-AKAP-Interaktion ist noch wenig bekannt. Auch wenn RI α hauptsächlich zytosolisch lokalisiert ist, zeigen verschiedene Studien eine Verankerung *in vivo*. Dabei scheint die dynamische Verankerung der RI α -Untereinheiten im Gegensatz zur statischen Verankerung der RII-Untereinheiten von entscheidender Bedeutung für die Zelle zu sein. So wurde die Assoziation der RI-Untereinheiten mit der Plasmamembran von Erythrozyten und aktivierten T-Lymphozyten beschrieben. Bei der cAMP-vermittelten Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die PKA Typ I könnte die Lokalisation des Enzyms möglicherweise auch durch AKAPs vermittelt werden. In knockout-Mäusen, die im Skelettmuskelgewebe keine regulatorischen Untereinheiten Typ II exprimieren, binden die RI α -Untereinheiten an ein mit Kalziumkanälen assoziiertes AKAP und erhalten so die normale, cAMP-abhängige Kanal-leitfähigkeit durch die korrekte Verfügbarkeit der katalytischen Untereinheiten der PKA.

In vivo konnte weiterhin gezeigt werden, dass die katalytischen Untereinheiten in der Zelle bevorzugt mit den RII-Untereinheiten assoziieren und Typ I-PKA-Holoenzym gebildet wird, wenn die Menge der freien katalytischen Untereinheiten die Menge der freien RII-Untereinheiten übersteigt.

Die Spezifität in der PKA-Verankerung wird durch die *targeting*-Domäne erreicht, ein Strukturmotiv, das im Gegensatz zu der *anchoring*-Domäne weder in der Sequenz noch in der Struktur der AKAPs konserviert ist. So werden AKAPs

durch Protein-Protein-Interaktionen an strukturelle Elemente in der Zelle und durch Protein-Lipid-Interaktionen an Membranen verankert.

In der Literatur sind verschiedene AKAPs beschrieben, die mit unterschiedlichen zellulären Kompartimenten assoziieren, so zum Beispiel mit den Zentrosomen, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, der Plasma- und Kernmembran und mit Vesikeln.

Die genauen Mechanismen der Verankerung sind bisher nur für einige AKAPs bekannt. So wird das herzmuskelspezifische Ankerprotein mAKAP durch eine Region mit drei spektrinartigen Wiederholungssequenzen an der perinukleären Membran der Kardiomyozyten verankert. Zwei Isoformen der AKAP15/18 werden durch Lipidmodifikationen (Myristoylierung und Palmitoylierung) an der Plasmamembran verankert. Drei polybasische Regionen in der *targeting*-Domäne des AKAP79 sind an der Lokalisation des Proteins an der inneren postsynaptischen Membran (PSD, *postsynaptic density*) beteiligt.

Die AKAPs wurden zuerst durch die Interaktion mit der PKA charakterisiert. Einige dieser Proteine können jedoch auch andere an der Signaltransduktion beteiligte Enzyme binden. Durch die gleichzeitige Verankerung von Enzymen, die gegensätzliche Reaktionen katalysieren, wie zum Beispiel Kinasen und Phosphatasen, können diese, auch als *scaffolding* (gerüstbildende) Proteine bezeichneten AKAPs ganze Signalkomplexe in der Nähe bestimmter Substrate lokalisieren und so zur Spezifität und Regulation der zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale beitragen. AKAP79 war das erste AKAP, für das die Interaktion mit mehreren Enzymen nachgewiesen werden konnte. Dieses Protein bindet die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und die Protein-

phosphatase Calcineurin (PP2B), wobei jedes Enzym in gebundenem Zustand inhibiert ist. Da unterschiedliche Signale für die Aktivierung jedes einzelnen Enzyms notwendig sind, können an dieser Stelle verschiedene *second messenger* wie cAMP, Kalzium und Phospholipide zusammentreffen. Weitere Beispiele sind das AKAP220, welches die PKA und die Proteinphosphatase PP1 an den Peroxisomen lokalisiert und das AKAP Yotiao, das neben der PKA ebenfalls die Proteinphosphatase PP1 bindet. Das AKAP CG-NAP bindet nicht nur die PKA und die Proteinphosphatase PP1, sondern auch noch die Rho-abhängige Kinase PKN (NGF (nerve growth factor) -aktivierte Proteinkinase) und die Proteinphosphatase PP2A.

Im Stand der Technik ist ein AKAP 18γ bekannt, was in verschiedenen Geweben wie in Wasserkanälen oder im Herzen entweder nicht exprimiert vorliegt oder aber keine Funktion wahrnimmt. Mit den bekannten AKAPs ist es auch noch nicht gelungen die Interaktion, beispielsweise mit PKA, zu visualisieren. Es ist lediglich durch Publikationen wie z. B. Klussmann et al. (1999) bekannt, dass auf Grund von gewissen Ergebnissen von einer Wechselwirkung ausgegangen werden muss, ohne dass diese selbst analysiert werden konnte.

Auch andere Proteine können mit AKAPs assoziieren, so bindet Ezrin, ein Mitglied der zytoskelett-assoziierten ERM-Familie Ezrin, Radixin und Moesin, das als AKAP identifiziert wurde, an ein Protein (EBP50/NHERF), welches an der Regulation des Natrium-Protonen-Transportes in der apikalen Membran von Epithelzellen beteiligt ist. AKAPs vermitteln die Modulation der Leitfähigkeit der Ionenkanäle durch die Lokalisation der Proteinkinasen und -phosphatasen in der Nähe bestimmter Kanaluntereinheiten, die wahrscheinlich

durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert werden.

Die Aktivität des NMDA-Rezeptors wird durch das AKAP Yotiao, welches auch die Proteinphosphatase PP1 bindet, moduliert. Die in gebundenem Zustand aktive Phosphatase limitiert die Kanalleitfähigkeit des NMDA-Rezeptors, bis die PKA durch cAMP aktiviert wird und den Ionenkanal oder ein assoziiertes Protein phosphoryliert, wodurch die Leitfähigkeit rapide ansteigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass myristoylierte Ht31-Peptide, die die Interaktion zwischen PKA und AKAP inhibieren, die cAMP-abhängige Inhibition der Interleukin 2-Transkription in Jurkat-T-Zellen aufheben und dass S-Ht31-Peptide die Spermienmotilität einschränken.

Auch bei den wichtigen komplexen biologischen Prozessen, wie die durch das Hormon GLP-1 (*glucagon-like peptide*)-vermittelte Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas und in RINm5F-Zellen (klonale β -Zelllinie der Ratte) sind AKAPs beteiligt. Die Aktivierung der PKA durch GLP-1 führt zur Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen und begünstigt die Exozytose von Insulin aus sekretorischen Granula. Die Ht31-Peptid-vermittelte Inhibition der PKA-Verankerung führte zu einer deutlichen Verringerung der Insulinsekretion. Dabei wurden weder die cAMP-Bildung noch die Aktivität der katalytischen Untereinheiten der PKA durch die Peptide beeinflusst. Weiterhin konnte nach Expression des wildtypischen AKAP18 α in RINm5F-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, welche AKAP18 α nicht exprimierten, eine Erhöhung der Insulinsekretion nach GLP-1-Applikation nachgewiesen werden.

Bisher wurde der Nachweis, dass es sich bei einem neuen Protein um ein AKAP handelt, durch Kopräzipitation er-

bracht. Dazu wurde ein Antikörper gegen das Kandidatenprotein hergestellt, um es aus Zellen oder Gewebe, in denen es exprimiert wird, immunopräzipitieren. Anschließend wurde das Vorhandensein von regulatorischen und/oder katalytischen PKA-Untereinheiten im Präzipitat mittels Western Blot untersucht. Die Anwesenheit der PKA-Untereinheiten im Präzipitat spricht dafür, dass das Kandidatenprotein in vivo als AKAP fungiert. Der Nachweis kann auch umgekehrt erbracht werden, indem die PKA-Untereinheiten immunpräzipitiert werden und anschließend das AKAP im Präzipitat nachgewiesen wird.

Dieser experimentelle Ansatz erlaubt aber keinen Rückschluss auf die intrazelluläre Lokalisation oder auf die in vivo-Situation eines AKAP-PKA-Komplexes. Es ist außerdem nicht möglich, die zeitliche und räumliche Auflösung von Interaktionen zu analysieren. Weiterhin ist es derzeit mit den bekannten Verfahren nicht möglich, spezifische AKAP-Inhibitoren oder -Aktivatoren zu identifizieren.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, neue Nukleinsäuresequenzen, die für Strukturen kodieren, zur Verfügung zu stellen, die in Verfahren eingesetzt werden können, in denen die Interaktion zwischen AKAP und PKA in vivo detektiert wird, wobei die Rückschlüsse auf die zelluläre Lokalisation dieser Interaktion erhalten werden können und die weiterhin in Verfahren eingesetzt werden können, mit denen membranpermeable Substanzen, insbesondere Peptide, detektierbar sind.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung einer isolierten Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe umfassend:

- a) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID Nr. 1 oder deren komplementären Nukleotidsequenzen,
- b) ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein,
- d) ein Nukleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) - c) degeneriert ist und
- e) ein Nukleinsäuremolekül gemäß einer Nukleotidsequenz nach a) - d), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis d) ist.

Die Bedingungen der Hybridisierung sind hierbei so gewählt, dass eine Hybridisierung mit bekannten Nukleinsäuremolekülen, insbesondere solchen, die für bekannte Spleißvarianten codieren, ausgeschlossen sind.

Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen eingesetzt werden können, um die Interaktion von AKAP und PKA Untereinheiten in vivo zu detektieren, wobei ein AKAP-PKA-Komplex einem zellulären Kompartiment zugeordnet werden kann, wobei sich der Begriff AKAP in diesem Zusammenhang auf die neue Spleißvariante bezieht.

Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nukleinsäuresequenzen bzw. den mit diesen Nukleinsäuresequenzen hybridisierenden Sequenzen funktionsanalog zu sein, dass die kodierten homologen Strukturen bei der

Interaktion mit PKA-Untereinheiten Merkmale aufweisen, die Rückschlüsse auf die in vivo Situation und die zelluläre Lokalisation zulassen sowie auf die Identifizierung spezifischer AKAP-Inhibitoren. Funktionsanalog heißt insbesondere, dass die kodierten Moleküle ein analoges Verhalten zu der neuen Spleißvariante AKAP 18 δ zeigen.

Mit dieser neuen Spleißvariante lassen sich Aufgaben lösen, die beispielsweise mit der bekannten Spleißvariante AKAP18 γ nicht zu lösen waren. Die Unterschiede zwischen dem bekannten AKAP18 γ und dem erfindungsgemäßen AKAP18 δ betragen auf der Nukleinsäureebene ca. 20%.

Die Proteinkinase A-Ankerproteine AKAP γ und das erfindungsgemäße AKAP18 δ sind verschiedene Spleißvarianten des AKAP18-Gens. AKAP18 δ enthält im Vergleich zu AKAP18 γ 27 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus, die durch ein Exon kodiert werden. AKAP18 δ besteht aus 353 und AKAP18 γ aus 226 Aminosäuren. Im überlappenden Sequenzbereich besteht eine 75 %ige Identität zwischen den beiden Proteinen.

Diese Unterschiede führen zu deutlichen Unterschieden in der Funktion zwischen dem bekannten und dem neuen Molekül. So ist z. B. AKAP δ im Gegensatz zu AKAP18 γ so an wasserkanalhaltigen Vesikeln positioniert, dass es eine essentielle Funktion wahrnehmen kann. Weiterhin ist AKAP δ an den Ca^{2+} -Kanälen im Herzen lokalisiert und nimmt dort wichtige Funktionen wahr, wohingegen AKAP18 γ im Herzen überhaupt nicht exprimiert wird. Demgemäß bestehen deutliche Unterschiede zwischen der bekannten und der anmeldungsgemäßen neuen Spleißvariante von AKAP18. Die neue Spleißvariante führt zu neuen und überraschenden Ergebnissen. So kann beispielsweise mit AKAP18 δ die Interaktion mit PKA besonders gut und effektiv visualisiert

werden. Auch wenn es zwischen dem bekannten AKAP18 γ und dem erfindungsgemäßen AKAP18 δ strukturelle Ähnlichkeiten gibt, sind die neuen Moleküle als Mittel zur erfindungsgemäßen Lösung besser geeignet als die bekannten. Ein Fachmann hätte weder auf Grund des allgemeinen Fachwissens oder auf Grund einer bestimmten Offenbarung annehmen können, dass die bestehenden strukturellen Unterschiede dieser beiden Moleküle so gering sind, dass sie keinen wesentlichen Einfluss auf die Eigenschaften haben, die für die Lösung der technischen Aufgabe von Bedeutung sind, und deshalb vernachlässigt werden können. Es ist aber vielmehr so, dass zwischen AKAP18 δ und AKAP18 γ neben den Gemeinsamkeiten deutliche strukturelle, wie auch funktionelle Unterschiede bestehen. Diese zeigen sich beispielsweise darin, dass AKAP18 δ in bestimmten Regionen des Körpers, wie z. B. in den Ca²⁺-Kanälen des Herzens exprimiert wird, wohingegen die bekannte Verbindung hier nicht exprimiert vorliegt.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung weist das Nukleinsäuremolekül mindestens 80 %, bevorzugt 90 % Homologie zu dem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül eine genomische DNA und/oder eine RNA; besonders bevorzugt ist das Nukleinsäuremolekül eine cDNA.

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor umfasst. Die Erfindung betrifft ganz besonders bevorzugt auch ein Polypeptid, was durch ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kodiert wird. Ein solches

Polypeptid ist bevorzugt eine neue Spleißvariante des AKAP18 (AKAP18δ).

Die Erfindung betrifft auch das Polypeptid bzw. Protein, das durch das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül kodiert wird.

Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nukleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nukleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so wechselwirken, dass eine Detektion dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nukleinsäuren sein, die an die genannten Nukleinsäuremoleküle oder Polypeptide binden, wie z. B. Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nukleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper. Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das Erkennungsmolekül ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.

Die Antikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Polypeptide, insbesondere AKAP18δ, spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein.

(z. B. oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Antikörper-Fragmente, wie Fab, $F(ab')_2$ und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

- (1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;
- (2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;
- (3) $F(ab')_2$, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt; $F(ab')_2$ ist ein Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;
- (4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und

- (5) Einzelketten-Antikörper ("SCA"), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet eine beliebige Antigen-Determinante auf dem Polypeptid, insbesondere AKAP18δ; Epitop-Determinanten bestehen normalerweise aus chemisch aktiven Oberflächen-Gruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren oder Zucker-Seitenketten, und besitzen normalerweise sowohl spezifische Merkmale der dreidimensionalen Struktur als auch spezifische Ladungsmerkmale.

Die Erfindung betrifft auch Vakzine oder eine pharmazeutische Zusammensetzung, die das Nukleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle, das Polypeptid und/oder das Erkennungsmolekül gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen. Bei dem pharmazeutisch akzeptablen Träger handelt es sich um an sich bekannte pharmazeutische Hilfs- und/oder Zusatzstoffe. Bei diesen, dem Fachmann an sich bekannten Zusatz- und Trägerstoffen, kann es sich auch um Liposomen bzw. um in der Gentechnik bekannte Strukturen bzw. Lösungen und/oder Puffergemische oder um andere Substanzen aus dem Bereich der Galenik handeln.

Weiterhin betrifft die Erfindung einen Kit, der die Nukleinsäuren, die Vektoren, die Wirtszelle, das Polypeptid, das Erkennungsmolekül und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung umfasst. Der Kit kann z. B. als Diagnosekit oder als Detektionskit verwendet werden, um insbesondere

AKAP-Inhibitoren oder die AKAP-PKA-Interaktion zu detektieren.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion umfassend die Schritte

- a) Bereitstellung eines ersten Vektors, insbesondere eines Plasmids, umfassend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kodierend (i) ein AKAP, insbesondere ein AKAP18 δ , und (ii) einen ersten Marker, insbesondere ein fluoreszierendes Protein,
- b) Bereitstellung eines zweiten Vektors, insbesondere eines Plasmids, umfassend ein zweites Nukleinsäuremolekül kodierend (i) eine regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase, bevorzugt RII α , RII β , RI α oder RI β , und (ii) einen zweiten Marker, insbesondere ein fluoreszierendes Protein,
- c) Einführen des ersten und zweiten Vektors in eine Zelle, wobei die Zelle transfiziert wird, und
- d) Durchführen einer Fluoreszenzresonanzenergietransfer-(FRET)-Messung, wobei die AKAP-PKA-Interaktion detektiert wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es überraschenderweise möglich, die AKAP-PKA-Interaktion, bevorzugt eine AKAP18-PKA-, besonders bevorzugt eine AKAP18 δ -PKA-Interaktion, in einer lebenden Zelle zu visualisieren und somit den AKAP-PKA-Komplex einem zellulären Kompartiment zuzuordnen.

In einem ersten Schritt des erfindungsgemäßen Verfahrens werden zwei Vektoren bzw. Plasmide bereitgestellt, wobei

z. B. das erste Plasmid das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, welches für AKAP18 δ kodiert, und mindestens ein weiteres Nukleinsäuremolekül umfasst, das für einen Marker, vorzugsweise für ein fluoreszierendes Protein kodiert. Das zweite Plasmid umfasst ebenfalls mindestens zwei Nukleinsäuremoleküle, wobei ein erstes Nukleinsäuremolekül die regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase, vorzugsweise RII α , kodiert und ein weiteres Nukleinsäuremolekül einen zweiten Marker, insbesondere ein zweites fluoreszierendes Fluoreszenzprotein, kodiert. Das erste und das zweite fluoreszierende Protein können hierbei insbesondere so ausgewählt werden, dass sie bei einer ausreichenden räumlichen Nähe zueinander zu einem Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) befähigt sind. Demgemäß kann es sich bei dem ersten fluoreszierenden Protein beispielsweise um das Cyan-fluoreszierende Protein (CFP) und bei dem zweiten fluoreszierenden Protein um das Yellow-fluoreszierende Protein (YFP) handeln. Dem Fachmann ist selbstverständlich bekannt, dass er vielfältige Moleküle verwenden kann, um eine messbare Interaktion zwischen Fluoreszenzmarkern wie z. B. einen Fluoreszenzresonanzenergietransfer zu ermöglichen oder einen bestehenden Fluoreszenzresonanzenergietransfer so zu modifizieren, beispielsweise zu inhibieren, dass eine Detektion einer Wechselwirkung von mindestens zwei Markermolekülen, insbesondere Fluoreszenzmarkern, möglich ist. Hierzu ist es erforderlich, dass der erste und zweite Vektor, die insbesondere Plasmide sind, mindestens eine Struktur aufweisen, die messbar als Markierung detektiert werden kann. Der Begriff Marker oder Markierung betrifft im Sinne der Erfindung alle Strukturen oder Verfahren, die zur Erzeugung eines nachweisbaren, vorzugsweise quantifizierbaren Signals verwendet werden können, und die insbesondere an eine Nukleinsäure oder ein Protein bzw. ein Fragment hiervon gebunden oder wirkverbundbar sind. Die Marker oder die Markierungen können insbesondere

mittels Fluoreszenz nachweisbare Signale erzeugen. Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Lehre wird die Wechselwirkung bzw. eine Modifikation der Wechselwirkung - z. B. als Inhibierung - bevorzugt in Form einer FRET-Messung detektiert. Selbstverständlich ist es auch möglich, mit Hilfe von Radioaktivität, Kolorimetrie, Gravimetrie, Röntgenbeugung oder -absorption, Magnetismus oder enzymatischer Aktivität Signale zu erzeugen, die isoliert gemessen oder im Zusammenhang mit einer Fluoreszenz bzw. einem Fluoreszenzresonanzergietransfervorgang Signale erzeugen, inhibieren oder modifizieren, so dass eine Interaktion von mindestens zwei biologischen Komponenten, vorzugsweise von zwei Proteinen, besonders bevorzugt zwischen einer Proteinkinase, bevorzugt PKA, und einem Proteinkinase A-Ankerprotein, bevorzugt AKAP18 δ , nachgewiesen werden kann. Eine Sonde im Sinne der Erfindung ist z. B. eine Nukleinsäure oder Aminosäuresequenz, die an einem oder beiden Enden oder intern mindestens eine Markierung aufweist, wobei die Markierung bevorzugt ein zur Fluoreszenz befähigter Farbstoff oder Marker oder ein die Fluoreszenz unterdrückender Farbstoff oder Marker ist. Eine Sonde im Sinne der Erfindung kann daher aber auch eine Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenz sein, die mindestens eine Markierung aufweist, die in der Lage ist, ein nachweisbares Signal zu modifizieren, insbesondere zu inhibieren. Eine solche Sonde kann beispielsweise eine Quencherstruktur sein, die die Fluoreszenz beispielsweise eines Markers oder Farbstoffs, z. B. eines Reporterfarbstoffs, im Zusammenhang mit einer Interaktion zwischen zwei Molekülen so beeinflusst, dass eine messbare Signaländerung erzeugt werden kann. So kann beispielsweise diese Quencherstruktur so ausgebildet sein, dass durch die Wechselwirkung mit einem Fluoreszenzfarbstoff kein Fluoreszenzsignal oder aber kein Energietransfersignal detektierbar ist, wenn die zur Fluoreszenz befähigte Struktur und

die zur Quenchung befähigte Struktur die hierfür erforderliche räumliche Nähe, beispielsweise bei einer Interaktion von Proteinase A-Ankerproteinen und Proteinkinasen aufweisen; in einem solchen System wäre ein Fluoreszenzsignal bzw. ein nicht-modifiziertes Fluoreszenzsignal so lange detektierbar, wie es zu einer Interaktion zwischen den markierten Strukturen kommt. Die Begriffe Quenching, Fluoreszenzresonanzenergietransfersignal oder einfach Fluoreszenz betreffen demgemäß Strukturen und Verfahren, durch die, falls ein fluoreszierendes und ein anderes fluoreszierendes bzw. ein quenchesendes Molekül räumlich nahe benachbart liegen, bei einer Anregung eines dieser Moleküle ein wesentlicher Teil der Energie des angeregten Zustandes ohne Strahlung auf den Quencher übertragen wird oder mit einer messbaren Strahlung an das System abgegeben wird. Auf den Quencher übertragene Energie kann beispielsweise ohne Strahlung verloren gehen oder in einer anderen Emissionswellenlänge als die des fluoreszierenden Moleküls emittiert werden. Das heißt, die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen oder den sie kodierenden Nukleinsäuren, insbesondere solchen, die mit der Proteinkinase A und dem Proteinkinase A-Ankerprotein assoziiert sind, kann entweder durch eine emittierende Strahlung oder aber durch die strahlungslose Übertragung der Energie auf einen Quencher detektiert werden.

Eine praktische Anleitung für die Auswahl geeigneter Fluoreszenz-Quencher-Paare für bestimmte Sonden ist in der Literatur verfügbar und in den nachstehenden Referenzen beispielhaft dargestellt: Pesce et al., Hrsg., Fluorescence Spectroscopy (Marcel Dekker, New York, 1971), White et al., Fluorescence Analysis: A Practical Approach (Marcel Dekker, New York, 1970). Die Literatur enthält auch Referenzen, die ausführliche Listen von fluoreszenten und chromogenen Molekülen und deren relevante optische Eigenschaften für die

Auswahl von Fluoreszenz-Quencher-Paaren bereitstellen; vgl. z.B. Berlman, Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules, 2. Auflage (Academic Press, New York, 1971), Griffiths, Colour and Constitution of Organic Molecules (Academic Press, New York, 1976), Bishop, Hrsg., Indicators (Pergamon Press, Oxford, 1972), Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (Molecular Probes, Eugene, 1992). Ferner findet sich in der Literatur eine ausführliche Anleitung für die Derivatisierung von Fluoreszenz- und Quencher-Molekülen für die kovalente Bindung über gewöhnliche reaktive Gruppen, die an ein Oligonukleotid angefügt werden können; vgl. US-PS 3,996,345, US-PS 4,351,760.

Beispielhafte Fluoreszenz-Quencher-Paare können aus Xanthen-Farbstoffen, einschließlich Fluoresceinen und Rhodamin-Farbstoffen ausgewählt werden. Viele geeignete Formen dieser Verbindungen sind kommerziell erhältlich und enthalten Substituenten auf ihren Phenylgruppen, die als Bindestelle oder als Bindefunktionalität für die Bindung an ein Oligonukleotid verwendet werden können. Eine weitere Gruppe von fluoreszenten Verbindungen sind Naphthylamine mit einer Aminogruppe in der alpha- oder beta-Position. Diese Naphthylamino-Verbindungen umfassen 1-Dimethylaminonaphthyl-5-sulfonat, 1-Anilino-8-naphthalensulfonat und 2-p-Toluidinyl-6-naphthalensulfonat. Andere Farbstoffe umfassen 3-Phenyl-7-isocyanatocoumarin, Acridine wie 9-Isothiocyanatoacridin-Orange, N-(p-(2-Benzoxazolyl)-phenyl)-maleimid, Benzoxydiazole, Stilbene, Pyrene. Bevorzugte Fluorophore sind weiterhin SYBR Green, Hex, TET, VIC, JOE, NED, Redmond Red, Alexa Red, Cascade Blue, Yakima Yellow, Cy3, Cy3.5, Tamra/Cy3, Texas Red, ROX, Cy5, Cy5.5, Carboxyrhodamine, LC705 und/oder LC640. Als Quencher können beispielsweise weiterhin eingesetzt werden Tamra, Rhodamin, BHQ1 bis BHQ3, Dansyl, Dabcyl, ElleQuencher und/oder

Methylorange. Bevorzugt kann auch eine Konjugation der Nukleinsäureproben mit Minor Groove Binder (MGB) sein. Derartige Strukturen sind beispielsweise in Kutayavin et al., 2000, Nucleic Acids Research beschrieben und sind in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen.

Erfindungsgemäß kann man zwei Arten von Quencherprozessen oder Prozessen, die eine Fluoreszenzstrahlung modifizieren, unterscheiden, einmal die dynamische Fluoreszenzlöschung durch Kollisionsprozesse und die statische Fluoreszenzlöschung durch Komplexbildung zwischen dem Fluorophor, das heißt dem Marker oder der Sonde und den Quencher- oder Löscher-Molekülen des Sonden-Quenchers. Das Quenching führt demgemäß zu einer Erniedrigung der Quantenausbeute, die durch Fluoreszenzanregung der markierten Sonde detektiert werden kann. Es ist aber beispielsweise auch möglich, dass die Sonden bei einer sehr hohen Konzentration, beispielsweise auf einem bestimmten Nukleinsäureabschnitt, zum sogenannten Selbstquenching neigen, das heißt, dass die einzelnen Moleküle in ihrer Bewegung so gestört werden, dass ebenfalls ein Quenchingeffect - bedingt durch die hohe Sondendichte - auftritt.

Denn im Sinne der Erfindung kann z. B. ein separat generiertes Fluoreszenzsignal, ein Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-Signal als auch ein "gequenhtes" Signal dazu dienen, eine AKAP-PKA zu detektieren, bevorzugt ist ein FRET-Signal. Das FRET-Signal wird insbesondere durch die Verwendung der Fluoreszenzstoffe CFP und YFP gewonnen.

Mit den beiden bereitgestellten Plasmiden wird eine Zelle transfiziert. Die Transfektion in Sinne der Erfindung kann über chemische, physikalische und/oder biologische Transfektionsmethoden vorgenommen werden. Die chemische Transfektion kann beispielsweise durch den Einsatz von

DEAE-Dextran, durch Dendrimere oder durch die Verwendung von Calciumphosphat vorgenommen werden. Bei der physikalischen Transfektion ist es beispielsweise möglich, mit Hilfe der Elektroporation die Membranen der Zellen so zu modifizieren, dass sie die zu transfizierende Plasmid-DNA aufnehmen. Eine weitere Methode der physikalischen Transfektion ist beispielsweise die Mikroinjektion oder die Einschleusung von DNA durch Beschuss mit beispielsweise Goldpartikeln. Methoden der biologischen Transfektion sind beispielsweise die rezeptorvermittelte Transfektion, die durch virale Komponenten unterstützte rezeptorvermittelte Transfektion und die Lipofektion. Dem Fachmann sind verschiedene Methoden zur Transfektion bekannt. Die Zellen, an denen die Transfektion vorgenommen werden kann, können prokaryotische oder eukaryotische Zellen sein, beispielsweise Bakterien-, Hefe-, Insekten-, Pflanzen- oder Säugerzellen oder aber auch Organismen wie transgene Tiere oder Pflanzen. In den eukaryotischen Systemen sind die Säugerzelllinien NS0, SP2/0, CHO-K1, CHO dhfr-, COS-1, COS-7, K562, Percy 6 oder bevorzugt HEK293-Zellen bevorzugt CD8-Zellen, LCCPK1, HeLazellen, MDCK2-Zellen, MCF7, Fibroblasten, MCF7, NIH3T3.

Nachdem die Zellen mit beiden Plasmiden unter den dem Fachmann bekannten Bedingungen kotransfiziert wurden, werden die beiden Fusionsproteine aus AKAP und erstem fluoreszierenden Protein und aus der regulatorischen Untereinheit einer Proteinkinase und dem zweiten fluoreszierenden Protein exprimiert. Sofern die exprimierten Fusionsproteine interagieren, kann dies auf Grund der Wechselwirkung der fluoreszierenden Proteine mit der Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Technik, insbesondere in lebenden Organismen, wie in Zellen detektiert werden. Die Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Technik beruht auf einem Energietransfer des ersten fluoreszierenden Proteins zu dem

zweiten fluoreszierenden Protein, der jedoch nur dann zustande kommt, wenn sich beide Fusionsproteine in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Die Fusionsproteine erreichen diese Nähe insbesondere dann, wenn das AKAP-Protein direkt an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase bindet. In diesem Fall kann ein Fluoreszenzresonanzenergietransfer nachgewiesen werden.

Das System kann auch für die Identifikation von Substanzen genutzt werden, die die Interaktion zwischen AKAP und regulatorischen Untereinheiten, bevorzugt RII α , aber auch RII β , RI α und β der PKA, inhibieren.

Durch die Bereitstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Fachmann das Verfahren beliebig modifizieren. Insbesondere ist es möglich, zu überprüfen, ob bestimmte Moleküle die Wechselwirkung von AKAP und PKA, insbesondere AKAP18 δ und RII α , beeinflussen. Hierzu kann das erfindungsgemäße Verfahren beispielsweise einmal in Gegenwart und einmal ohne das zu untersuchende Molekül durchgeführt werden, wobei der Vergleich des mit dem und ohne das zu untersuchende Molekül durchgeführten Verfahrens einen Hinweis auf den Inhibitionscharakter des Moleküls gibt. Sofern z. B. kein FRET-Signal in Gegenwart des Moleküls gemessen wird, ist dies ein Hinweis darauf, dass das Molekül die Wechselwirkung zwischen AKAP und PKA inhibiert..

Dem Fachmann ist bekannt, durch welche Kontrollversuche er ausschließen kann, dass das Molekül den FRET selbst unterdrückt; weiterhin ist ihm bekannt, wie er detektieren kann, ob das Molekül AKAP, PKA-Untereinheiten oder deren spezielle Wechselwirkung beeinflusst, vorzugsweise inhibiert.

Die Identifizierung spezifischer AKAP-Inhibitoren hat ein großes therapeutisches Potential. AKAP-PKA-Interaktionen

spielen bei verschiedenen exozytotischen Prozessen eine Rolle, deren Fehlregulation zur Entstehung von Krankheiten wie Diabetes insipidus, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Magenulzera oder Schilddrüsenerkrankungen führt. Bei der Herzinsuffizienz kommt es zu einer PKA-vermittelten Hyperphosphorylierung eines Ionenkanals, des Ryanodinrezeptors (Calciumkanal). Substanzen, die bestimmte AKAP spezifisch inhibieren, könnten als Pharmaka bei diesen Erkrankungen eingesetzt werden.

Das Verfahren ist außerdem geeignet, die Membranpermeabilität von Peptiden zu erfassen. Bislang gibt es keine Möglichkeit einen Membrantransfer von Peptiden direkt nachzuweisen bzw. zu quantifizieren. Dies kann insbesondere erreicht werden, indem ein Konjugat aus dem zu untersuchenden Molekül, insbesondere ein Peptid und S-Ht31 bzw. ein Gemisch mit dem Peptid Ht31 hergestellt wird. Es ist jedoch jede RII-Bindungsdomäne jedes AKAPs möglich.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung wird die Zelle mit einem membranpermeablen Peptid in Kontakt gebracht. Hierbei ist es beispielsweise möglich, dass die Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Messung einmal ohne Zugabe des membranpermeablen Peptids und einmal mit Zugabe des membranpermeablen Peptids durchgeführt wird, wodurch detektiert werden kann, ob das membranpermeable Peptid die AKAP-PKA-Interaktion modifiziert, insbesondere unterbindet. Eine kontinuierliche Abnahme des Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Signals während der Messung bedeutet beispielsweise eine Inhibition der Interaktion zwischen AKAP und der regulatorischen Untereinheit der Proteinkinase in Gegenwart des membranpermeablen Peptids. Es ist weiterhin auch möglich, bekannte membranpermeable Peptide einzusetzen, die die Interaktion zwischen AKAP und PKA inhibieren, wobei bei den membranpermeablen Peptiden bestimmte

Modifikationen, wie beispielsweise Aminosäuredeletionen oder Substitutionen, untersucht werden, um einen Hinweis zu erhalten, welche Aminosäuren in einem membranpermeablen Peptid essentiell sind, um die AKAP-PKA-Interaktion zu unterdrücken bzw. zu fördern.

Das Neue des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht in der Visualisierung der AKAP-PKA-Interaktion in einer lebenden Zelle und in der Möglichkeit, den AKAP-PKA-Komplex einem zellulären Kompartiment zuzuordnen.

Das Verfahren ist jedoch sehr viel breiter verwendbar. Es ermöglicht ein Hochdurchsatzverfahren zur Identifikation und quantitativen Analyse von Substanzen, die die AKAP-PKA-Interaktion beeinflussen. Darüber hinaus kann die Membrangängigkeit von Peptiden bestimmt werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure, des Vektors, der Wirtszelle, des Polypeptids, des Erkennungsmoleküls, der pharmazeutischen Zusammensetzung, des Kits und/oder des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion, einer AKAP- und/oder PKA-Inhibition und/oder eines membranpermeablen Peptids. Durch die Bereitstellung der genannten erfindungsgemäßen Strukturen und Verfahren hat der Fachmann die Möglichkeit, diese in zahlreichen Bereichen der Grundlagenforschung und Klinik einzusetzen. Es kann beispielsweise geprüft werden, ob ein Molekül ein AKAP- oder PKA-Inhibitor ist. Weiterhin kann geprüft werden, ob ein Molekül die Wechselwirkung von AKAP und PKA modifiziert. Weiterhin kann detektiert werden, ob ein Molekül, insbesondere ein Peptid, membranpermeabel ist.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Beispiele

Es wurde zunächst die cDNA einer neuen Spleißvariante des Proteinkinase A-Ankerproteins (AKAP) AKAP18 identifiziert und isoliert (Fig. 1). Diese Variante wird als AKAP18 δ bezeichnet. Die AKAP18 δ -cDNA wurde in den kommerziell erhältlichen Vektor pECFP (BD Biosciences, Clontech Heidelberg) kloniert. Die cDNA der regulatorischen Untereinheit RII α der humanen Proteinkinase A, die von Prof. Dr. K. Tasken (Universität Oslo) zur Verfügung gestellt wurde, wurde in den kommerziell erhältlichen Vektor pEYFP (BD Biosciences, (Clontech, Heidelberg) kloniert. Eukaryotische HEK293-Zellen (GBF, Braunschweig) wurden mit den Plasmiden kotransfiziert.

Die Interaktion der exprimierten Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP wurde mittels der FluoreszenzResonanzEnergieTransfer (FRET)-Technik in den HEK293-Zellen gemessen (schematische Darstellung in Fig. 3). Die FRET-Signale beruhen auf einem Energietransfer von CFP zu YFP, der nur zustande kommt, wenn sich beide Proteine in unmittelbarer Nähe zueinander befinden (< 10 nm). CFP und YFP erreichen diese Nähe nur, wenn AKAP18 δ die RII α -Untereinheit direkt bindet. In diesem Fall kann ein FRET nachgewiesen werden. Die Spezifität der Interaktion von AKAP18 δ und RII α kann dadurch überprüft werden, dass FRET in Gegenwart des membranpermeablen Peptids S-Ht31, das die Interaktion zwischen dem AKAP und der RII-Untereinheit verhindert, gemessen wird. Eine kontinuierliche Abnahme des FRET-Signals während der Messung bedeutet eine Inhibition der Interaktion zwischen AKAP18 δ und RII α .

Die Sequenz des Peptids S-Ht31 entspricht der der PKA-Bindungsdomäne (RII-Bindungsdomäne) des AKAP Ht31. Es bildet eine amphipathische Helix aus und bindet kompetitiv an die regulatorischen PKA-Untereinheiten. Dadurch verhindert es die Interaktion mit AKAP18δ. Die Membranpermeabilität erhält das Peptid durch die Kopplung an einen Stearatrest am N-Terminus (Klussmann et al. J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999). Peptide mit der gleichen Aminosäuresequenz (Ht31), die keinen Stearatrest tragen und damit nicht membranpermeabel sind, verändern das FRET-Signal in dem System nicht. Ebenso verändert Stearat-gekoppeltes S-Ht31-Peptid, das durch Einfügen von zwei Prolinen, die die amphipathische Helix stören, das FRET-Signal nicht.

Teil der Charakterisierung eines neu identifizierten AKAP ist der Nachweis, dass es in vivo als AKAP, das heißt als PKA-Interaktionspartner, fungiert. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, die Interaktion von AKAP18δ und den RIIα-Untereinheiten der PKA in lebenden Zellen nachzuweisen. Es ist damit dazu geeignet, den Nachweis zu erbringen, dass AKAP18δ als AKAP in vivo fungiert. Gleichzeitig lässt das System Rückschlüsse auf die intrazelluläre Lokalisation des AKAP18δ-RIIα-Komplexes zu.

AKAP sind eine Familie von über 50 Proteinen, deren Funktion bislang nicht durch spezifisch interagierende Substanzen manipuliert werden kann. Das Peptid S-Ht31, mit dem die Bindung von AKAP18δ und RIIα inhibiert wurde (s.o.), ist bisher die einzige bekannte Substanz, die eine AKAP-Funktion beeinflusst. Es inhibiert die AKAP-PKA-Interaktion, allerdings entkoppelt es die Bindung zwischen jeglichem AKAP und allen regulatorischen PKA-Untereinheiten. Mit diesem entwickelten System sollen membranpermeable Peptide sowie niedermolekulare, nicht-

peptidische Substanzen in gezielten Hochdurchsatzuntersuchungen mittels FRET-Messungen identifiziert werden, die die Interaktion zwischen AKAP18 δ und RII α spezifisch inhibieren.

Herstellung von Plasmiden, die für die Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP kodieren

Die kodierende Region der von uns identifizierten AKAP18 δ -cDNA (Fig. 1; Sequenz AKAP18 δ) wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu wurden forward-Primer (Position in AKAP18 δ : bp 57-76) mit der Sequenz 5' CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG GAG CGC CCC GCC GCG GG 3' und reverse-Primer (Position in AKAP18 δ : bp 1095 - 1118) mit der Sequenz 5' GGC GAC CGG TGG ATC CCG GGC CCG GTT GTT ATC ACT GCC ATC GCC 3', die eine EcoRI- bzw. eine BamHI-Restriktionsschnittstelle tragen, eingesetzt. Als Polymerase wurde der Advantage cDNA polymerase-Mix nach Herstellerangaben eingesetzt. Der benötigte 10x PCR-Puffer wurde mit dem Advantage cDNA polymerase-Mix mitgeliefert. Die Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurden als dNTP-Mix in den PCR-Ansatz pipettiert (Reaktionsansatz siehe unten).

Die für RII α kodierende cDNA wurde mittels PCR aus dem Plasmid amplifiziert. Dazu wurden forward-Primer (Position in RII α : bp 190 - 210) mit der Sequenz 5' TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG AGC CAC ATC CAG ATC CCG 3' und reverse-Primer (Position in RII α : bp 1382 - 1401) mit der Sequenz 5' GAC CGG TGG ATC CCG GGC CTG CCC GAG GTT GCC CAG AT 3', die eine XhoI- bzw. eine BamHI-Restriktionsschnittstelle tragen, eingesetzt. Als Polymerase wurde wieder der Advantage cDNA polymerase-Mix eingesetzt. Ebenso wurden der oben beschriebene 10x PCR-Puffer und der dNTP-Mix eingesetzt.

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation von AKAP18 δ und RII α wurden wie folgt angesetzt:

DNA	5 μ l
dNTP-Mix [10 μ M]	1 μ l
Forward-Primer [10 μ M]	1 μ l
Reverse-Primer [10 μ M]	1 μ l
Advantage cDNA polymerase-Mix (5 Einheiten/ μ l)	0,2 μ l
H ₂ O	<u>41,8 μl</u>
Gesamtvolumen	50 μ l

Reaktionsbedingungen:

1 Zyklus	95 °C, 5 min
30 Zyklen	94 °C, 30 sec
	58 °C, 30 sec
	72 °C, 2 min
1 Zyklus	72 °C 10 min
4 °C,	∞

Das erhaltene AKAP18 δ -cDNA-Amplifikat (Länge: 1061 bp) wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI behandelt, das erhaltene RII α -cDNA-Amplifikat (Länge: 1211 bp) mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI. Anschließend wurden die Ansätze in einem Agarosegel aufgetrennt und die AKAP18 δ - bzw. RII α -Amplifikate mittels der Geneclean-Methode aus dem Gel eluiert.

Die AKAP18 δ -cDNA wurde in das mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnittene Plasmid, das für das Cyan Fluoreszierende Protein (CFP) kodiert (pECFP, BD Biosciences), einkloniert. Die RII α -cDNA wurde in das mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnittene Plasmid, das für das Yellow Fluoreszierende Protein (YFP)

kodiert (pEYFP, BD Biosciences), einkloniert. Die erhaltenen Plasmide kodieren somit für die Fusionsproteine AKAP18 δ -CFP bzw. RII α -YFP. Escherichia coli-Bakterien (Stamm JM109) wurden mit der Plasmid-DNA transformiert. Die in den Bakterien vermehrte Plasmid-DNA wurde mittels der Qiagen-Midi-Plasmidpräparationsmethode entsprechend den Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) isoliert und mittels Transfektion in HEK293-Zellen eingeführt (s.u.).

HEK293-Zellen (GBF, Braunschweig) wurden auf Polylysin-beschichteten 30 mm-Deckgläschen in Dulbecco's Minimal Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert, bis eine Konfluenz von 40 - 60 % erreicht war. Die Zellen wurden mittels der Liptofectamine-Methode (Gibco Invitrogen, Karlsruhe) mit den AKAP18 δ -CFP- und RII α -YFP-Plasmiden (1 - 2 μ g je DNA) transient transfiziert (Verhältnis von AKAP18 δ -CFP-:RII α -YFP-Plasmid-DNA von 1:4).

Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)-Messungen

HEK293-Zellen wurden transient mit den für RII α -YFP und AKAP18 δ -CFP kodierenden Plasmiden kotransfiziert. FRET-Messungen wurden 24 - 48 h nach der Transfektion an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Daten wurden mittels der Openlab 2.25 Software (Improvision, Coventry GB) gespeichert. Die Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 425 für CFP und 488 nm für YFP angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde bei Wellenlängen von 480/30 für CFP und 535/26 nm für YFP gemessen. FRET von CFP zu YFP wurde durch Anregung von CFP bei einer Wellenlänge von 425 nm und der Messung der Emission von YFP bei einer Wellenlänge von 535/26 nm bestimmt. Die unspezifische Hintergrundfluoreszenz wurde in einer Region ohne Zellen bestimmt und subtrahiert. Da die Einstellungen am Mikroskop unverändert

blieben, konnte in allen Experimenten ein Verhältnis von $535/480 > 0,6$ als positives FRET-Signal bezeichnet werden.

Bei FRET-Experimenten müssen falsch-positive Signale ausgeschlossen werden. Diese sind darauf zurückzuführen, dass bei der Anregung von CFP auch YFP angeregt wird. Des Weiteren strahlt die CFP-Emission auch in den Bereich der YFP-Emission hinein. Das Kontrollexperiment zum Nachweis richtig-positiver FRET-Signale erfolgt durch ein Akzeptor-Ausbleichungs-Protokoll (donor recovery after acceptor bleaching). Das Experiment wurde an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wird bei einer Anregung von 425 nm die Emission bei 480/30 und 535/26 nm mit einer 12 bit CCD-Kamera (Imago, TILL-Photonics, Martinsried, Deutschland) erfasst. Nach Bestimmung der Basis-Signale erfolgt dann eine starke Anregung von YFP bei einer Wellenlänge von 488 nm, die zum Verlust des YFP-Emissionssignals führt (acceptor bleaching). Die Emission von CFP, die bei einer Wellenlänge von 480/30 nm bestimmt wird, steigt sofort an, da FRET unterbrochen wird (donor recovery). In diesem System musste YFP durch mehrmalige starke Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm ausgebleichen werden, da die Lichtquelle nicht energiereich genug ist. Das Ausbleichen und damit der Verlust des YFP-Emissionssignals geschieht somit stufenweise. Dadurch steigt die Emission von CFP, die bei einer Wellenlänge von 480/30 nm bestimmt wird, kontinuierlich und nicht in einem einzigen Schritt an. Der Anstieg der CFP-Emission wird daher über einen Zeitraum von etwa 120 sec nach Beginn der Akzeptor-ausbleichung gemessen.

Um die Spezifität des FRET weiter zu untersuchen und zu testen, ob sich die kotransfizierten HEK293-Zellen dazu eignen, membranpermeable Substanzen zu identifizieren, die

die Interaktion zwischen $\text{RII}\alpha$ -YFP und AKAP18 δ -CFP modulieren, wurden die Zellen mit dem membranpermeablen Peptid S-Ht31 (100 μM) inkubiert, das generell AKAP-RII-Interaktionen hemmt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem Peptid S-Ht31-P, das keinen Einfluss auf die AKAP-RII-Interaktion hat (Klußmann et al., J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999), inkubiert. FRET-Messungen wurden in Intervallen von 10 min über insgesamt 90 min durchgeführt.

Ergebnis

Zum direkten Nachweis einer Interaktion von AKAP18 δ und den regulatorischen $\text{RII}\alpha$ -Untereinheiten der PKA in vivo wurden HEK293 mit Plasmiden kotransfiziert, die für AKAP18 δ -CFP und $\text{RII}\alpha$ -YFP kodieren. Fig. 2 belegt die Koexpression beider Proteine in den gleichen Zellen. Die Expression von $\text{RII}\alpha$ -YFP wurde durch Anregung bei 488 nm und Messung der emittierten Fluoreszenz bei 535/26 nm nachgewiesen (Fig. 2A), die von AKAP18 δ -CFP durch Anregung der Fluoreszenz bei 425 nm und Messung der emittierten Fluoreszenz bei 480/30 nm (Fig. 2B). Beide Fusionsproteine zeigten eine diffuse, zytosolische Verteilung. Anschließend wurden FRET-Messungen an den gleichen Zellen durchgeführt. Dazu wird der Donor CFP bei einer Wellenlänge von 425 nm angeregt. Hält sich ein geeigneter Akzeptor in seiner unmittelbaren Nähe auf (Abstand < 10 nm), führt die Anregung des Donors zu einem teilweisen Energietransfer auf den Akzeptor YFP, der dann bei einer Wellenlänge von 545 nm fluoresziert (schematische Darstellung in Fig. 3). Demnach wurden zum Nachweis von FRET die HEK293-Zellen (CFP) bei einer Wellenlänge von 425 nm angeregt und es wurde die Emission von YFP bei einer Wellenlänge von 535/26 nm gemessen. Fig. 2C zeigt eine ähnliche Verteilung der dargestellten YFP-Emission wie in Fig. 2A. Somit hat ein Energietransfer von CFP nach YFP stattgefunden. Fig. 1D zeigt die farbkodierte Darstellung

der berechneten Ratio 535/480 von etwa 1.2 - 1.5 der FRET-Signale in diesen Zellen.

Die Spezifität der gemessenen FRET-Signale wurde mittels des Akzeptor-Ausbleichungs-Protokolls überprüft. Fig. 4A beschreibt die Kinetik der von YFP und CFP emittierten Fluoreszenz. Dargestellt ist das Verhältnis von F/F_{\max} in Abhängigkeit von der Zeit (Zeit in sec). F_{\max} entspricht der maximalen Emission von YFP bzw. CFP. Vor der Akzeptor-ausbleichung beträgt die F/F_{\max} von YFP annähernd 1, die von CFP etwa 0,92. Die Akzeptorausbleichung, beginnend nach 40 sec, führt zu einer starken Abnahme des Emissionssignals von YFP. Die F/F_{\max} für CFP steigt von etwa 0.91 auf etwa 1 an. Aus dem Anstieg der CFP-Emission um etwa 10 % ergibt sich eine FRET-Effizienz von etwa 10 %. Die Regressionsanalyse (Fig. 4B) bestätigt diese Beobachtung. Diese Daten zeigen eine direkte Interaktion von AKAP18 δ und RII α .

Um die Spezifität der Interaktion von AKAP18 δ und RII α und damit des FRET weiter zu untersuchen, aber auch um zu testen, ob sich die kotransfizierten HEK293-Zellen dazu eignen, membranpermeable Substanzen zu identifizieren, die die Interaktion von AKAP18 δ und RII α modulieren, wurden FRET-Messungen in Gegenwart des membranpermeablen Peptids S-Ht31 durchgeführt. Dieses Peptid hemmt generell die Interaktion zwischen AKAP und regulatorischen PKA-Untereinheiten (Klussmann et al., J. Biol. Chem. 274, 4934-4938, 1999; s. schematische Darstellung Fig. 5A und B). Fig. 6A zeigt das farbkodierte FRET-Signal (Verhältnis 535/480) von AKAP18 δ zu RII α in zwei HEK293-Zellen. Vor der Zugabe von S-Ht31 (Zeitpunkt 0 min) betrug die Ratio 535/480 etwa 1.3. Eine Abnahme des Verhältnisses 535/480 (weniger rot) korreliert direkt mit der Abnahme der Interaktion von CFP und YFP. Die Zugabe von S-Ht31 (100 μ M, nach Zeitpunkt 0) induzierte eine Abnahme des Verhältnisses

535/480 nm um über 50 % innerhalb von 80 min. Der Mittelwert des Verhältnisses betrug etwa 0.35. Fig. 6B zeigt Zellen, die mit dem wirkungslosen Kontrollpeptid S-Ht31-P inkubiert wurden, das keinen Einfluss auf die AKAP-RII-Interaktion hat. Hier ändert sich das farbkodierte FRET-Signal kaum. Fig. 6C zeigt eine Zusammenfassung der erhaltenen Daten aus Fig. 6A und B. Dargestellt ist die Veränderung des FRET-Signals (in %) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Graphik zeigt die an den Zellen beobachtete Veränderung des FRET-Signals in Gegenwart von S-Ht31 oder S-Ht31-P.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HEK293-Zellen, die AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP koexprimieren, ein geeignetes System zur Identifizierung membranpermeabler Substanzen darstellen, die die Interaktion zwischen diesem AKAP und RII α inhibieren.

AKAP bindet regulatorische PKA-Untereinheiten über ein konserviertes Strukturmotiv (amphipathische Helix). Daher kann eine Interaktion jedes AKAP mit einer regulatorischen PKA-Untereinheit in diesem System mittels FRET bestimmt werden. Diese Möglichkeit bedeutet, dass das System für die Suche nach spezifischen, membranpermeablen Inhibitoren für jede AKAP-PKA-Interaktion nutzbar ist.

Die unterschiedliche Primärstruktur von AKAP18 δ und AKAP18 γ führt zu ihrer unterschiedlichen subzellulären und gewebespezifischen Verteilung und ist für ihre unterschiedlichen Funktionen verantwortlich. So kommt beispielsweise AKAP18 γ im Kern von Maus-Oozyten vor und spielt möglicherweise bei der Gentranskription eine Rolle (Brown et al., 2003). Darüber hinaus wurde AKAP18 γ in den zytosolischen und partikulären Fraktionen von nicht näher

identifizierten Nierenzellen der Ratte gefunden. Die Identifizierung des/der Zelltyps/Zelltypen war bei den Experimenten nicht möglich; da Homogenate von gesamten Nieren verwendet wurden. Nach einer Ultrazentrifugation der Homogenate wurden Überstände und Sedimente als zytosolische bzw. partikuläre Fraktionen bezeichnet; so beispielsweise von Trotter et al., (1999). Durch die Erfinder der anmeldungsgemäßen Lehre konnte gezeigt werden, dass AKAP18 γ sowohl im Zytosol als auch im Kern von Hauptzellen der renalen Sammelrohre der Ratten vorkommt. In den Hauptzellen reguliert das antidiuretische Hormon Arginin-Vasopressin (AVP) die Wasserrückresorption durch Umverteilung des Wasserkanals Aquaporin-2 (AQP2) aus intrazellulären Vesikeln in die dem Urin zugewandte Seite der Plasmamembran (Klussmann et al., 2000). Die Funktion von AKAP18 γ in den Hauptzellen ist unbekannt. AKAP18 δ ist wie AKAP18 γ im Zytosol und im Kern renaler Hauptzellen lokalisiert, aber im Gegensatz zu AKAP18 γ kolokalisiert es mit AQP2 an intrazellulären Vesikeln (Fig. 7). Die Vesikel enthalten auch regulatorischen RIIP -PKA-Untereinheiten aber keine Proteine, die typischerweise bzw. ausschließlich an anderen Zellorganellen vorkommen (Fig. 7). AKAP18 δ kann daher PKA an den Vesikeln verankert, eine Funktion die das bekannte AKAP18 γ nicht erfüllen kann. Weiterhin konnte eine direkte Beteiligung des erfindungsgemäßen AKAP18 δ an der Vasopressin-vermittelten Wasserrückresorption in den renalen Hauptzellen beispielsweise durch FRET-Experimente gezeigt werden. Als Modellsystem dienten hierbei CD8-Zellen (Valenti et al., 1996). Hierbei handelt es sich um eine permanente Zelllinie aus Kaninchennieren, die stabil das

AQP2 der Ratte exprimiert. Die Stimulation der Zellen mit Forskolin (direkter Aktivator der Adenylzyklase, Überspringen der Vasopressinrezeptoraktivierung) führt analog der Stimulation nativer Hauptzellen durch Vasopressin zu einer Translokation von AQP2 in die apikale Plasmamembran. Wie weiter unten ausgeführt, wurden die CD8-Zellen mit den erfindungsgemäßen AKAP18 δ CFP- und RII α YFP-Konstrukten kotransfiziert. Die Stimulation der Zellen mit Forskolin induzierte nicht nur die Translokation von AQP2 in die apikale Plasmamembran sondern auch die Dissoziation des AKAPs und der PKA (Fig.8). Der molekulare Mechanismus der Dissoziation beruht möglicherweise auf einer Phosphorylierung einer PKA-Konsensusphosphorylierungssequenz in der PKA-Bindungsstelle des AKAPs. Diese Phosphorylierung verhindert dann aufgrund elektrostatischer Abstoßung die Bindung der PKA an AKAP18 δ .

Neben diesen allgemeinen Unterschieden der Struktur und Funktion zwischen der bekannten und der neuen Spleißvariante konnten auch deutlich organspezifische Unterschiede gezeigt werden. Im Gegensatz zu der bekannten Spleißvariante verankert AKAP18 δ die PKA an Ca²⁺-Kanälen und -Rezeptoren in Herzmuskelzellen

Die Herzmuskelkontraktion wird durch die Erhöhung des zytosolischen Ca²⁺ in Herzmuskelzellen hervorgerufen (Berridge et al., 2003; Fig. 9). Das Ca²⁺ gelangt durch L-Typ-Ca²⁺-Kanäle von außen in die Zellen nachdem ein Aktionspotential die Zellen erreicht hat und die Öffnung der in der Plasmamembran lokalisierten Kanäle bewirkt hat. Das einströmende Ca²⁺ bindet an Ryanodin R2-Rezeptoren

(RyR2) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), aktiviert sie und induziert den Efflux von Ca^{2+} aus dem SR durch RyR2 in das Zytosol. Das zytosolische Ca^{2+} verursacht über mehrere Zwischenschritte die Kontraktion des Zytoskeletts und damit der Herzmuskelzelle. Die Ca^{2+} -ATPase SERCA2a ist durch das Zurückpumpen des Ca^{2+} aus dem Zytosol in das SR wesentlich an der Beendigung der Kontraktion beteiligt. SERCA2a wird durch die Bindung des Proteins Phospholamban (PLN) inhibiert. Mit dem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} wird die Inhibition durch Dissoziation des PLN von SERCA2a aufgehoben.

Die Stärke der Herzmuskelzellkontraktion und damit die Stärke der Kontraktion des gesamten Herzmuskels wird durch die Menge des Ca^{2+} im Zytosol moduliert. Ein physiologischer Modulator der Ca^{2+} -Menge in den Herzmuskelzellen ist z.B. Adrenalin, das an β -Rezeptoren auf der Oberfläche von Herzmuskelzellen bindet. Der Bindung an diese Rezeptoren folgt die Aktivierung der PKA, die L-Typ Ca^{2+} -Kanäle, RyR2, PLN und das Zytoskelettprotein Troponin C phosphoryliert. Die Phosphorylierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen und RyR2 verstärkt ihre Ca^{2+} -Leitfähigkeit und erhöht somit die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration. Phosphoryliertes Troponin C erhöht die Kontraktilität des Zytoskeletts. Die Phosphorylierung von PLB bewirkt seine Dissoziation von SERCA2a und dadurch einen verstärkten Rücktransport des Ca^{2+} aus dem Zytosol in das SR. Dadurch steht für die nächste Herzmuskelkontraktion vermehrt Ca^{2+} zum Einstrom in das Zytosol zur Verfügung. Die sog. β -Blocker, die z.B. zur Therapie des Bluthochdrucks eingesetzt werden, verhindern diese

Phosphorylierungseignisse durch Blockade der β -Rezeptoren und senken somit die Herzkontraktilität und die Herzschlagfrequenz.

So konnte in erfindungsgemäßen Western Blot-Untersuchungen gezeigt werden, dass AKAP18 δ im Herzen exprimiert wird, AKAP18 γ hingegen nicht. So zeigen immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (Fig. 10) mit einem anti-AKAP18 δ -Antikörper eine Kolo-kalisation von AKAP18 δ mit RyR2, SERCA2a und PLN. Des Weiteren kolo-kalisiert AKAP18 δ mit den regulatorischen RII α - und β -Untereinheiten der PKA in den Herzzellen. Es konnte demgemäß gezeigt werden, dass AKAP18 δ die PKA in räumlicher Nähe zu RyR2, SERCA2a und PLN verankert und deren Phosphorylierung ermöglicht.

AKAP18 α , das auch als AKAP15 bezeichnet, ist eine weitere Spleißvariante des AKAP18-Gens. Das entsprechende Protein besteht aus 81 Aminosäuren. Es ermöglicht die Phosphorylierung von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen im Skelettmuskel von Kaninchen durch die Verankerung der PKA am L-Typ Ca^{2+} -Kanal (Hulme et al., 2002).

Aus dem o. g. kann geschlussfolgert werden, dass AKAP18 γ und AKAP18 δ in ihrer Primärstruktur, in ihrer subzellulären Lokalisation, in der gewebsspezifischen Verteilung und ihrer Funktion deutliche Unterschiede aufweisen.

Fig. 7. AQP2, PKA und AKAP18 δ und/oder ein 55 kDa AKAP kommen auf den gleichen intrazellulären Vesikeln vor. Die innere Medulla von Rattennieren wurde homogenisiert und die Nuklei und Zelldebris durch Zentrifugation entfernt. Der resultierende postnukleäre Überstand wurde mit affinitätsgereinigten anti-AKAP18 δ Antikörpern inkubiert, die an eine Eupergit C1Z-Methacrylatmatrix gekoppelt (AKAP18AB beads). Nichtgesättigte Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit Glycin blockiert. Zur Kontrolle wurden beads nur mit Glycin beschichtet (glycine beads). Unsere biochemischen Analysen zeigen, dass der anti-AKAP18 δ -Antikörper in der partikulären Fraktion von Hauptzellen AKAP18 δ und ein 55 kDa AKAP erkennt. Der Antikörper detektierte AKAP18 γ in der löslichen Fraktion von Hauptzellen und in deren Kern. Glykosyliertes (g) und nichtglykosyliertes (ng) AQP2, regulatorische RII β PKA-Untereinheiten und als Kontrolle Marker für die Plasmamembran (nichtglykosyliertes AQP4, AQP4-ng), das endoplasmatische Retikulum (calnexin), Mitochondrien (cytochrome c oxidase subunit IV, COX IV) und das Zytoskelett (tubulin) wurden mit kommerziell erhältlichen Antikörpern mittels Western blot detektiert.

Fig. 8. AKAP18 δ spielt in der Signalkaskade, die zur Translokation von AQP2 in die apikale Plasmamembran renaler Hauptzellen führt, eine Rolle. A: CD8-Zellen wurden mit Plasmiden, die für RII α -YFP und AKAP18 δ -CFP kodieren kotransfiziert. FRET wurde vor und nach Stimulation der Zellen mit Forskolin (100 μ M) gemessen. Hier dargestellt

sind zwei repräsentative Zellen, die jeweils die zwei Fusionsproteine koexprimieren. FRET wurde vor der Forskolingabe (0 sec) und 95 und 600 sec später (95 sec and 600 sec) gemessen. Das FRET-Signal (Ratio 535/480 nm) ist in Falschfarben kodiert. B: Quantitative Analyse des Effekts von Forskolin auf das FRET-Signal (n = 6 cells). Masstab, 20 μm .

Fig. 9. Calciumsignale im Herzen (aus Berridge et al., 2003). Lokale Ca^{2+} -Signale sind für die Kontraktion und möglicherweise für die Gentranskription verantwortlich (Ca^{2+} , rote Kreise). Ca^{2+} -Signale (Ca^{2+} signalling) beginnen mit ihrer Amplifikation in der Nähe von L-Typ Ca^{2+} -Kanälen an den T-Tubuli. Als T-Tubuli werden Regionen im Herzen bezeichnet, an denen sich die Plasmamembran der Herzzellen und die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) in unmittelbarer Nähe befinden. Die Depolarisation der Plasmamembran (T-tubule membrane) führt zu einer lokalen, pulsativen Erhöhung des zytosolischen Ca^{2+} , das dann zum Ryanodin R2-Rezeptor 2 (RyR2) diffundiert und RyR2 aktiviert. Durch RyR2 gelangt dann Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol (cytoplasm) und diffundiert von dort bis es die Kontraktion versucht. Die Kontraktion wird beendet indem das Ca^{2+} durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) aus den Zellen herausgepumpt wird oder durch SERCA in das SR zurückgepumpt wird. Ein Teil des Ca^{2+} wandert über die Mitochondrien, wo es metabolische Vorgänge stimuliert, die ATP für die Kontraktion und die Transkription zur Verfügung stellen. Im SR gelangt das Ca^{2+} zielgerichtet zu der an den T-Tubuli lokalisierten SR-Membran (tunnelling) und wird für den nächsten Herzschlag wieder freigesetzt. Die Zirkulation des

Ca^{2+} wird durch *second messenger* wie zyklisches AMP (cAMP) moduliert. Zyklisches AMP hebt die inhibitorische Wirkung von Phospholamban (PLN) auf. Ein anderer *second messenger*, zyklische ADP-Ribose (cADPR) aktiviert SERCA, so daß eine größere Menge freisetzbaren Ca^{2+} im SR vorliegt.

Fig. 10. Die Lokalisation von AKAP18 δ , Ryanodin R2-Rezeptor 2 (RyR2), SERCA2a und Phospholamban (PLN), regulatorischen RII α - und β -Untereinheiten der PKA in Herzzellen der Ratte. Es wurden 5 μm -Schnitte aus Rattenherzen hergestellt. AKAP18 δ wurde mit einem von uns hergestellten und charakterisierten anti-AKAP18 δ -Antikörper (Henn et al., Manuskript in Vorbereitung) und Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern detektiert. Die gleichzeitige Detektion der in der Abbildung genannten Proteine erfolgte mit kommerziell erhältlichen Antikörpern und Cy5-gekoppelten Sekundärantikörpern. Die Cy3- und Cy5-Fluoreszenzsignale (grün bzw. rot) wurde mit einem Laser scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena) aufgenommen. Die Koloalisation von AKAP18 δ mit den anderen Protein zeigt sich im Überlagerungsbild (overlay) anhand der Gelbfärbung.

Literatur

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. Nature Rev. Mol Cell. Biol., 4, 517-529.

Brown, R.L., August, S.L., Williams, C.J. and Moss, S.B. (2003) AKAP7 γ is a nuclear RI-binding AKAP. Biochem. Biophys. Res. Comm., 306, 394-401.

Henn, V., Edemir, B., Stefan, E., Schmitt, R., Vossebein, L., Lorenz, D., Tamma, G., Beyermann, M., Krause, E., Herberg, F.W., Valenti, G., Bachmann, S., Rosenthal, W., and Klusmann, E. Evidence for a role of novel A-kinase anchoring protein 18 isoforms in the vasopressin-induced aquaporin-2 shuttle in renal principal cells. Manuskript in Vorbereitung.

Hulme, J.T., Ahn, M., Hauschka, S.D., Scheuer, T. and Catterall, W.A. (2002) A novel leucine zipper targets AKAP15 and cyclic AMP-dependent protein kinase to the C terminus of the skeletal muscle Ca²⁺ channel and modulates its function. J. Biol. Chem., 277, 4079-4087.

Klusmann, E., Maric, K. and Rosenthal, W. (2000) The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 141, 33-95.

Trotter, K.W., Fraser, I.D., Scott, G.K., Stutts, M.J., Scott, J.D. and Milgram, S.L. (1999) Alternative splicing

regulates the subcellular localization of A-kinase anchoring protein 18 isoforms. J. Cell Biol., 147, 1481-1492.

Valenti,G., Frigeri,A., Ronco,P.M., D'Ettorre,C. and Svelto,M. (1996) Expression and functional analysis of water channels in a stably AQP2-transfected human collecting duct cell line. J. Biol. Chem., 271,24365-24370; correction (1997) J. Biol. Chem. 272, 26794.

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend
 - a) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz nach SEQ ID Nr. 1,
 - b) ein Nukleinsäuremolekül umfassend eine Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) funktionsanalog zu sein,
 - c) ein Nukleinsäuremolekül, das in Folge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) degeneriert ist und
 - d) ein Nukleinsäuremolekül gemäß einer Nukleotidsequenz nach a) - c), welches durch Deletionen, Additionen, Substitutionen, Translokationen, Inversionen und/oder Insertionen modifiziert und funktionsanalog zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) bis c) ist.
2. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die unter b) angegebene Nukleotidsequenz mindestens 80 %, bevorzugt 90 % homolog zu einer der unter a) angegebenen Nukleotidsequenz ist.
3. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA ist.

4. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 4.
6. Polypeptid, kodiert durch ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3.
7. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, einen Vektor gemäß Anspruch 4, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 5 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 6.
8. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, ein Vektor gemäß Anspruch 4, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 5, ein Polypeptid gemäß Anspruch 6 und/oder ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, umfasst.
10. Kit, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, ein Vektor gemäß Anspruch 4, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 5, ein Polypeptid gemäß Anspruch 6, ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen

Träger, und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 9 umfasst.

11. Verfahren zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion umfassend die Schritte

- a) Bereitstellung eines (i) ersten Vektors umfassend ein erstes Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 1-3 und einen ersten Marker und eines (ii) zweiten Vektors umfassend ein zweites Nukleinsäuremolekül kodierend eine regulatorische Untereinheit einer Proteinkinase und einen zweiten Marker,
- b) Einführen des ersten und des zweiten Markers in eine Zelle, wobei die Zelle transfiziert wird und
- c) Durchführen einer Fluoreszenzresonanzenergietransfer-(FRET)-Messung, wobei die AKAP-PKA-Interaktion detektiert wird.

12. Verfahren nach dem vorhergehenden Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion zwischen AKAP und RII α , RII β , RI α und/oder RI β detektiert wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass ein AKAP und/oder ein PKA-Inhibitor identifiziert wird, indem das Verfahren jeweils mit und ohne Zusatz des zu untersuchenden Inhibitors durchgeführt wird und einen Hinweis auf den AKAP- und/oder PKA-Inhibitor gibt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass

ein membranpermeables Molekül indentifiziert wird, indem ein Konjugat aus dem zu untersuchenden membranpermeablen Molekül und einem membranpermeablen AKAP-PKA-Inhibitor hergestellt wird und die AKAP-PKA-Interaktion mit und ohne Konjugat oder das Molekül detektiert wird.

15. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 3, eines Vektors nach Anspruch 4, einer Wirtszelle nach Anspruch 5, eines Polypeptids nach Anspruch 6, eines Erkennungsmoleküls nach Anspruch 7 oder 9, einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 9, eines Kits nach Anspruch 10 und/oder eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 11 bis 14 zur Detektion einer AKAP-PKA-Interaktion oder eines AKAP- und/oder PKA-Inhibitors und/oder eines membranpermeablen Peptids.

1/16

Fig. 1A

AKAP188**Aminosäuresequenz****M**ERPAAGEIDANKCDHLSRGEETGDLETSPV

GSLADLPFAAVDIQDDCGLPDVPOGNVPOGNPKRSKENRGDRNDHVKKRK
KAKKDYQPNYFLSIPITNKKITAGIKVLQNSILRQDNRLTKAMVGDGSFH
ITLLVMQLLNEDEVNIGTDALLELKPFVEEILEGKHLTLPFHGIGTFQGG
VGFVKLADGDHVSALLEIAETAKRTFQEKGILAGESRTFKPHLTFMKLSK
APMLWKKGVRKIEPGLYEQFIDHRFGEEILYQIDLCSMLKKKQSNNGYYHC
ESSIVIGEKKRKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETQNKQKQPG
GNSVKAEEGDRNGDGSNNRK

Nukleotidsequenz**ATGG**AGCGCCCCGCCGCGGGAGAAATAGATGCCAATAAGTGTGA

TCATTTATCAAGAGGAGAGGAAGGGACGGGGGACCTGGAGACCAGCCCTG
TAGGTTCTCTGGCAGACCTGCCGTTTGCTGCCGTAGACATTCAAGATGAC
TGTGGACTCCCTGATGTACCTCAAGGAAATGTACCTCAAGGAAACCCAAA
GAGAAGCAAAGAAAATAGAGGCGACAGGAATGATCACGTGAAGAAGAGGA
AGAAGGCCAAGAAAGATTATCAACCCAACTATTTCTGTCCATTCCAATC
ACCAACAAAAAGATTACAGCTGGAATTAAAGTCTTGCAAAATTCGATACT
GAGACAGGATAATCGATTGACCAAAGCCATGGTCGGCGACGGCTCCTTTC
ACATCACCTTGCTAGTGATGCAGCTATTAAACGAAGATGAAGTAAACATA
GGTACCGACGCGCTTTTGGAAGTGAAGCCGTTTCGTTGAGGAGATCCTTGA
GGGGAAGCATCTGACTTTGCCCTTCCACGGGATTGGCACTTTCCAAGGTC
AGGTTGGCTTTGTGAAGCTGGCAGACGGAGATCAGTCACTGCCCCTCCTG
GAGATAGCAGAGACTGCAAAAAGGACATTTAGGAAAAAGGCATCCTGGC
TGGAGAAAGCAGAACTTTTAAGCCTCACCTGACCTTTATGAAGCTGTCCA
AAGCACCAATGCTCTGGAAGAAGGGAGTGAGAAAAATAGAGCCTGGATTG
TATGAGCAATTTATCGACCACAGATTTGGAGAAGAAATACTGTACCAAT
AGATCTCTGCTCCATGCTGAAGAAAAAACAGAGCAATGGTTATTACCACT
GCGAGTCTTCGATCGTGATCGGTGAGAAGGACCGAAAGGAGCCTGAGGAT
GCTGAAGTGGTCAGGCTCAGTAAGAGGCTGGTGGAGAACGCCGTGCTCAA
GGCTGTCCAGCAGTACCTAGAAGAGACACAGAACAAAAAGCAGCCGGGGG
AGGGGAAGTCCGTCAAAGCTGAGGAGGGAGATCGGAATGGCGATGGCAGT
GATAACAACCGGAAGTGA

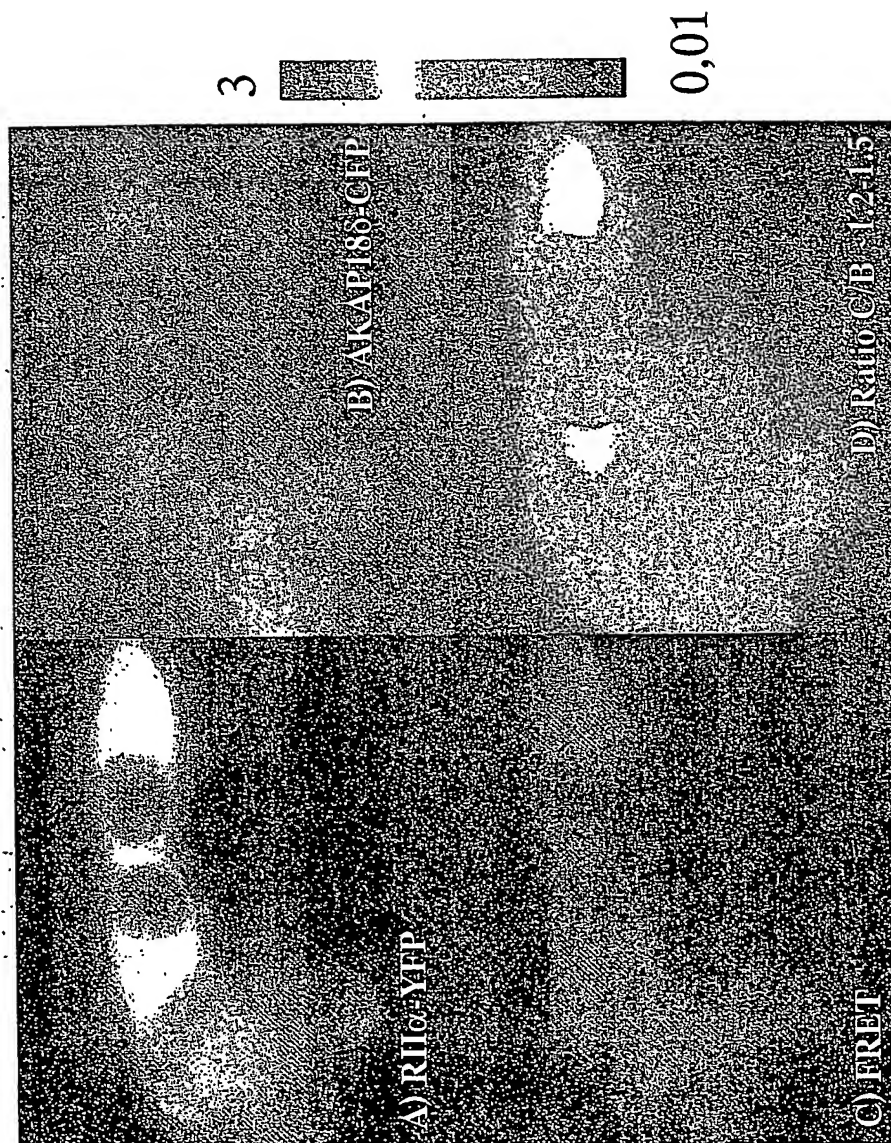
2/16

Fig. 1B

AKAP18δ	1	MERPAAGEIDANKCDHLSRGEEGTGDLETSPVGSIADEPRAAVDIQDDCG
AKAP18γ	1	-----MSEEFETANTMDSLVDMPFATVDIQDDCG
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	51	TPDVPOGNVPOGNPKRSKENRGDRNDHVKKRKKAKKDYQPNYFLSIPITN
AKAP18γ	29	ITDEP-----QINLKRSQENNEWVSDQVKKRKKKKDYQPNYFLSIPITN
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	101	KKITAGIKVILQNSITRODNRLTKAMVGDGSFHTITLLVMQLLINEDEVNIGT
AKAP18γ	74	KETIKGIKVILQNAITQODERTAKAMVSDGSFHTITLLVMQLLINEDEVNIGI
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	151	DALLELKPFVEEITLEGKHLITLPHGCTCTFOGQVGFVKLAEGDHVSALLEI
AKAP18γ	124	DALLELKPFVEEITLEGKHLITLPHGCTCTFGNOVGFVKLAEGDHVNSLLEI
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	201	AETAKRTFOEKGILAGESRLEKPHLITFMKLSKAPMLWKKGVKIEPGLYE
AKAP18γ	174	AETANRTFOEKGILVGESRSFKPHLITFMKLSKSPWLRKNGVKIEPDLYE
AKAP18β	1	-----
mAKAP18α	1	-----
hAKAP18α	1	-----
AKAP18δ	251	QFIDHREFGEEILYQIDEC SMLKKQSNGYHCESS-----IT
AKAP18γ	224	KFTSHREFGEEILYRIDEC SMLKKQSNGYHCESS-----IT
AKAP18β	1	-----MGQLCCFPFSRDEGKISELESSSSAVLQRYSKDIPSW
mAKAP18α	1	-----MGQLCCFPFARDEGKICE-----
hAKAP18α	1	-----MGQLCCFPFSRDEGKISE-----
AKAP18δ	287	VIGEKDRKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKKQPGEGNSV
AKAP18γ	260	VIGEKNGGEPDDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKNKPGE GSSV
AKAP18β	38	SSGEKNGGEPDDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKNKPGE GSSV
mAKAP18α	19	----KDRKEPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKKQPGEGNSV
hAKAP18α	19	----KNGGEPDDAELVRLSKRLVENAVLKAVQOYLEETONKNKPGE GSSV
AKAP18δ	337	KAEFGDRNGEGSDNNRK*
AKAP18γ	310	KTEAADQNGNDNENNRK*
AKAP18β	88	KTEAADQNGNDNENNRK*
mAKAP18α	65	KAEFGDRNGEGSDNNRK*
hAKAP18α	65	KTEAADQNGNDNENNRK*

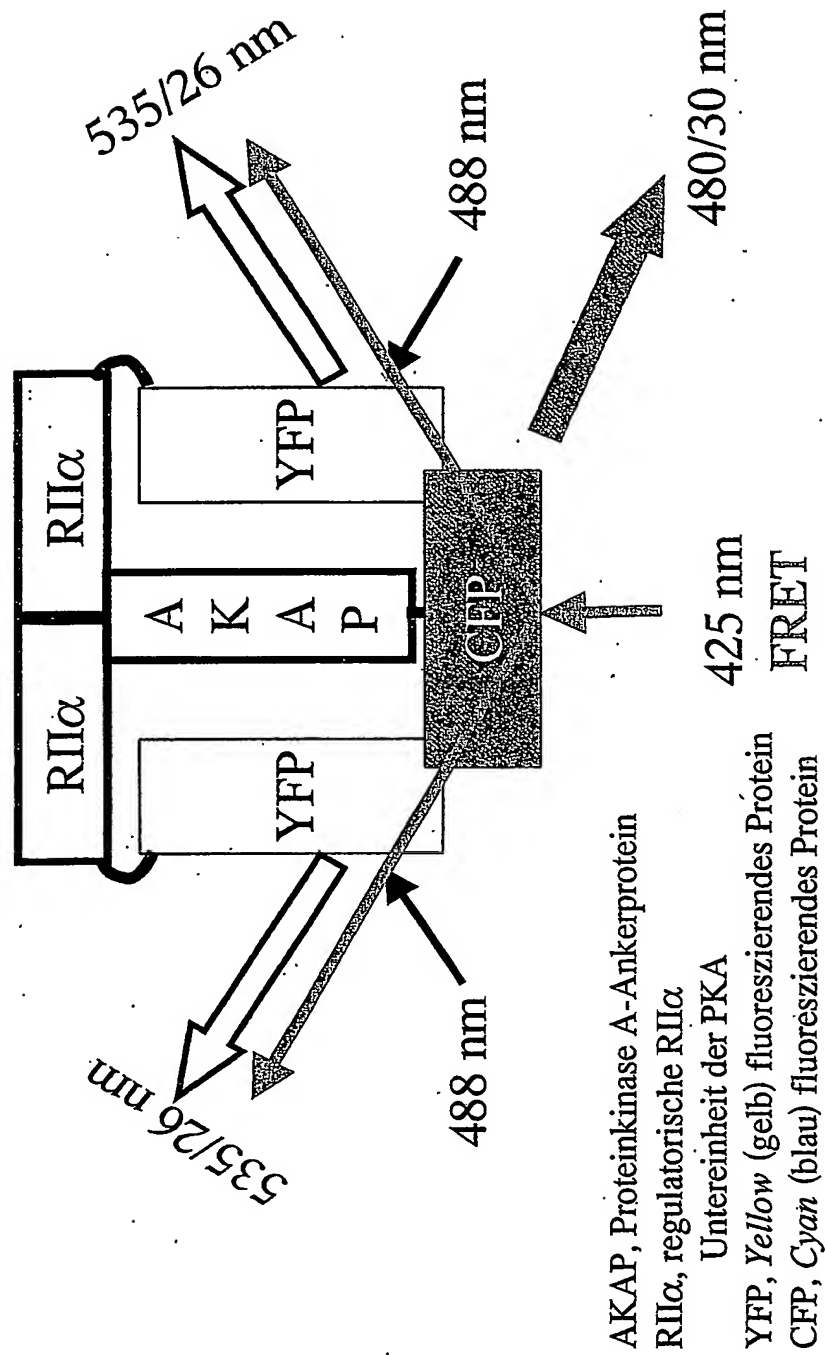
3/16

Fig. 2: Die Interaktion von AKAP18 δ -CFP
und RII α -YFP



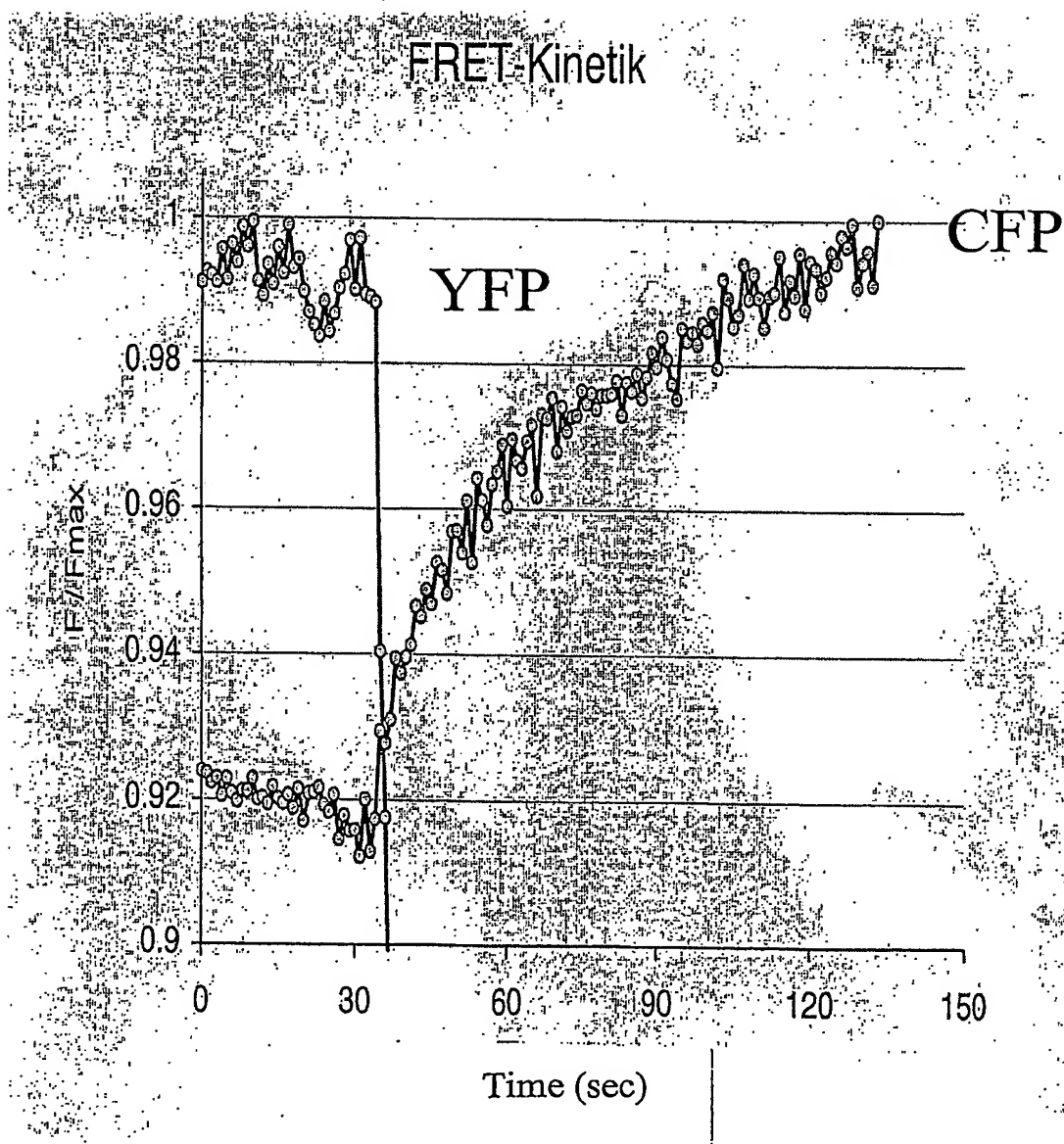
4/16

Fig. 3: FluoreszenzResonanzEnergieTransfer (FRET)
zwischen AKAP188-CFP und RII α -YFP



5/16

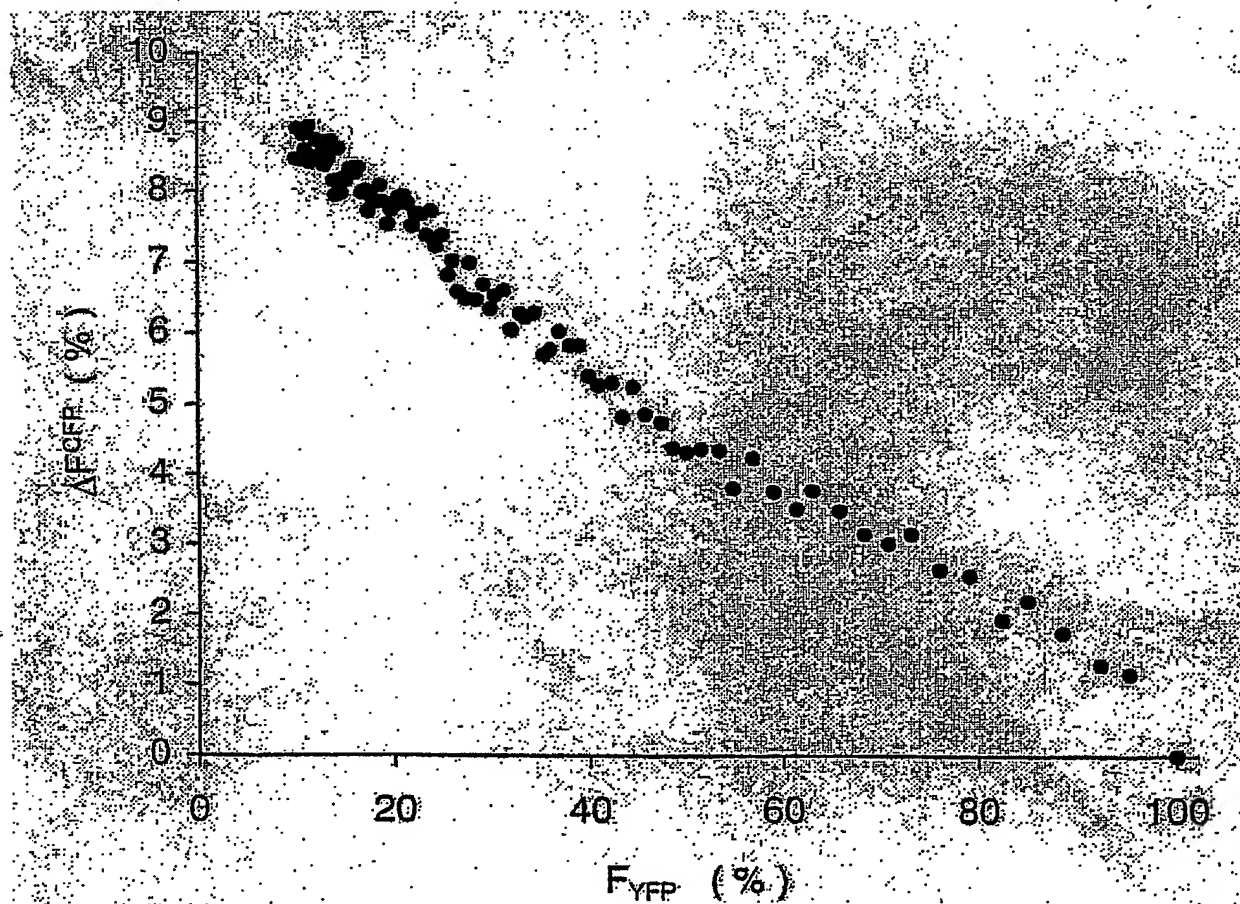
Fig. 4 A



6/16

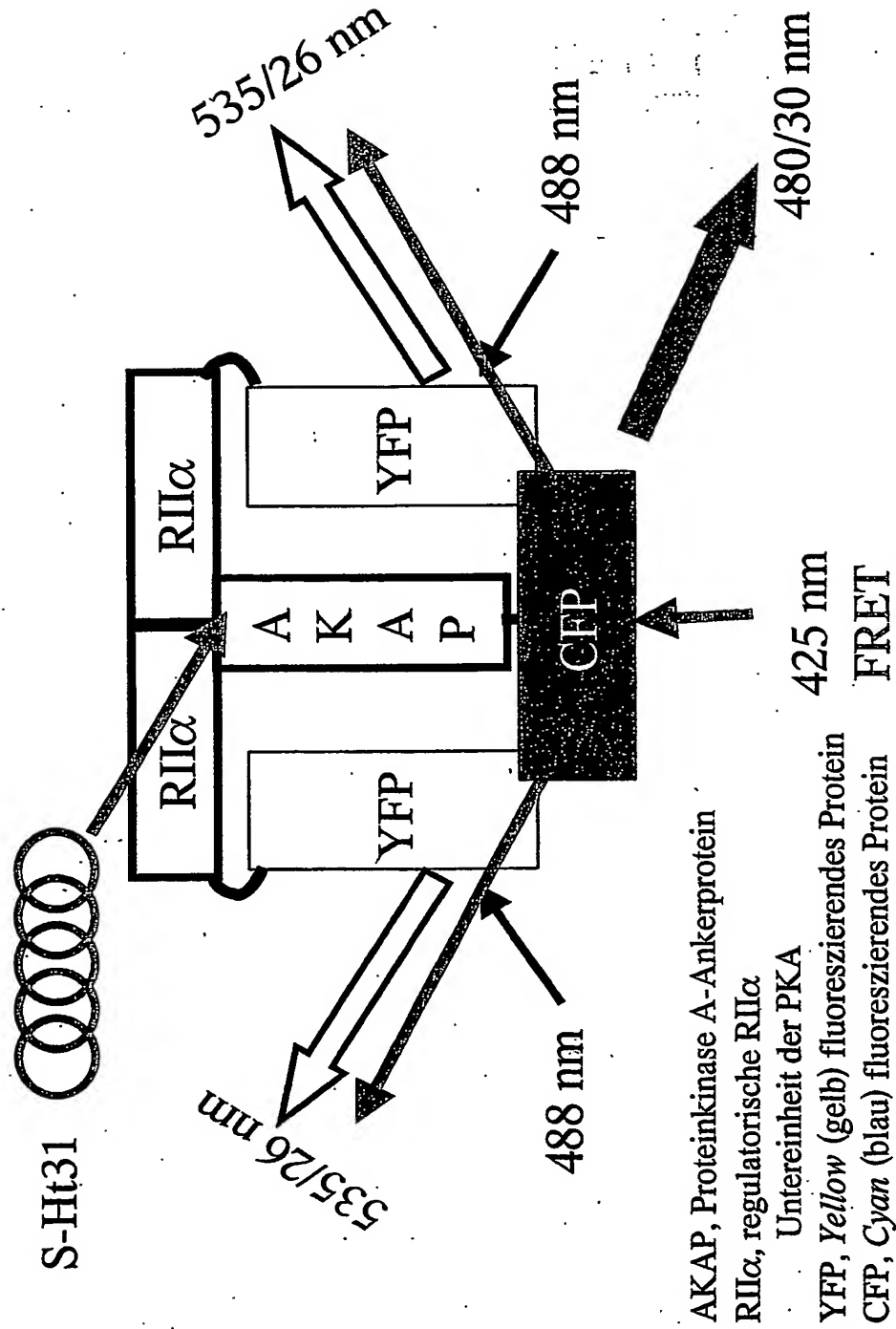
Fig. 4B

Die Ausbleichung des Akzeptors YFP (RII α -YFP) führt zu einer Zunahme der vom Donor CFP (AKAP18 δ -CFP) emitierten Fluoreszenz



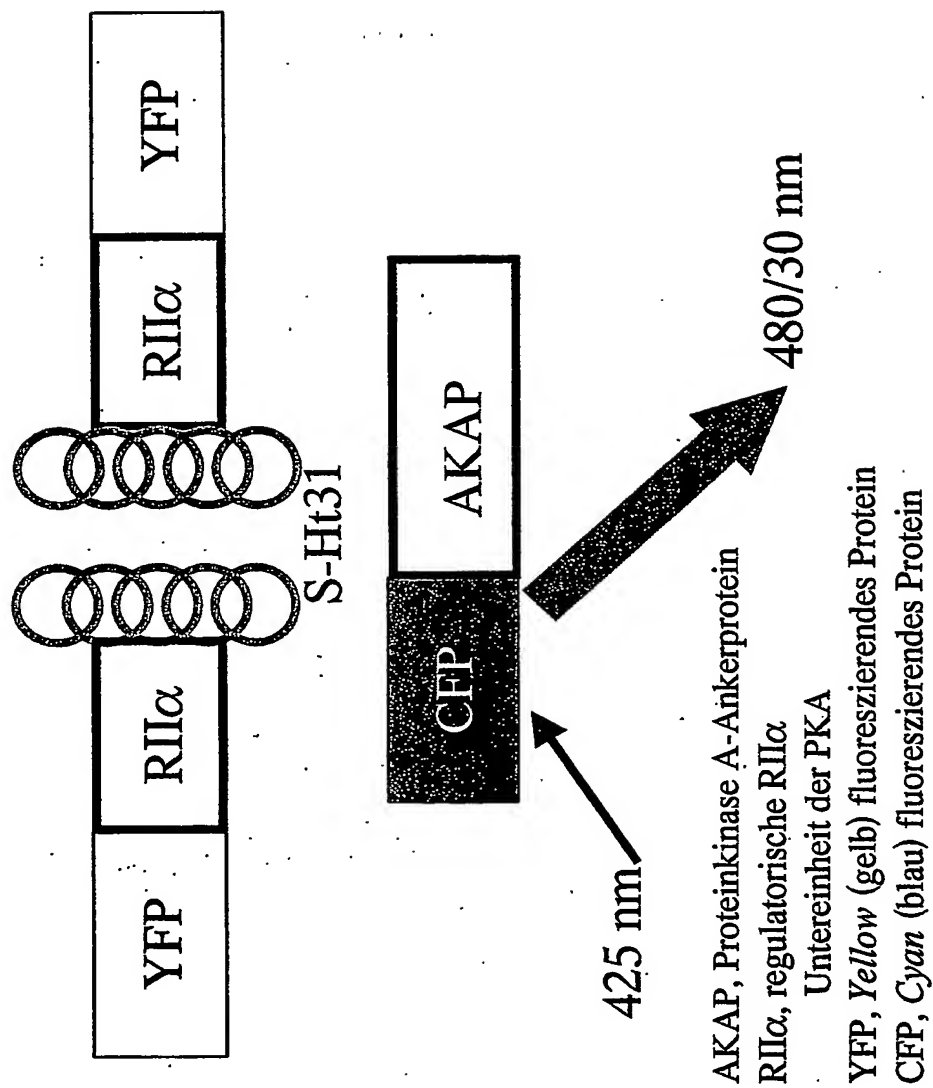
7/16

Fig. 5A: Hemmung der Interaktion von
AKAP188-CFP und RII α -YFP durch das Peptid S-Ht31



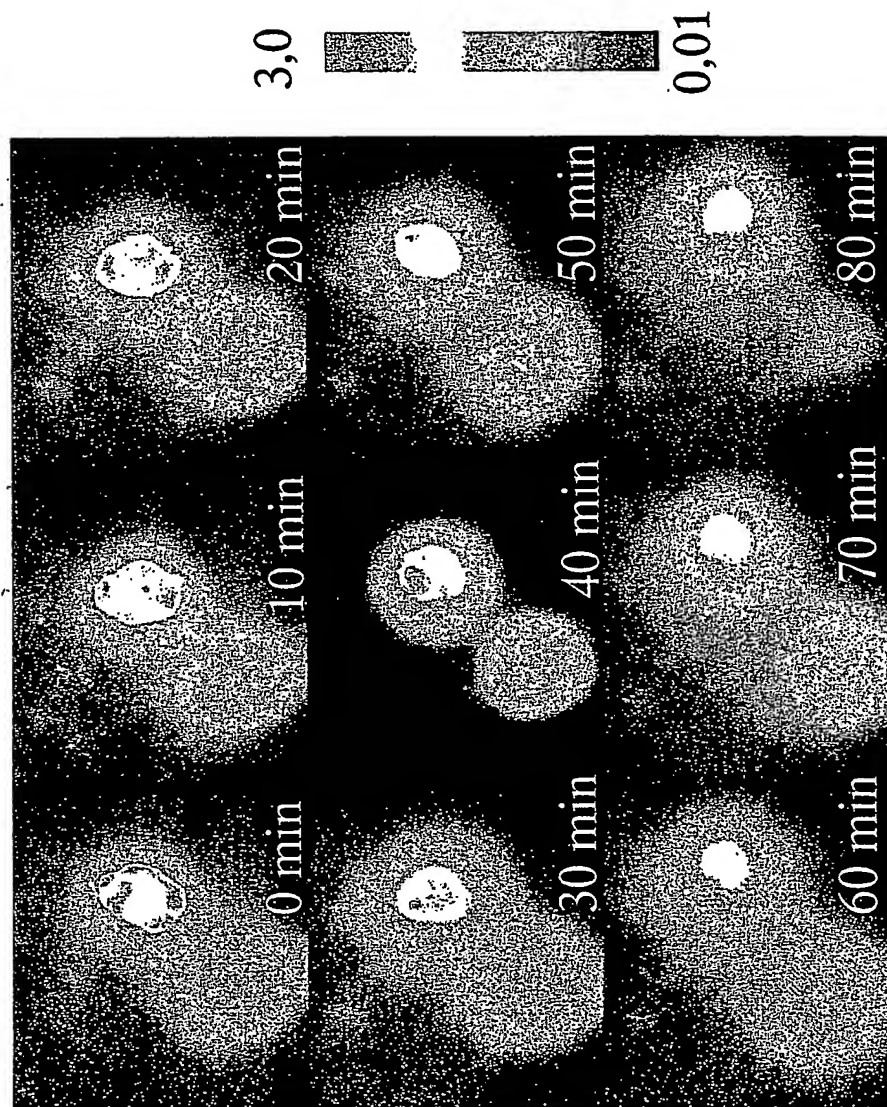
8/16

Fig. 5B: Resultat der Hemmung der Interaktion zwischen AKAP18δ-CFP und RIIα-YFP durch S-Ht31



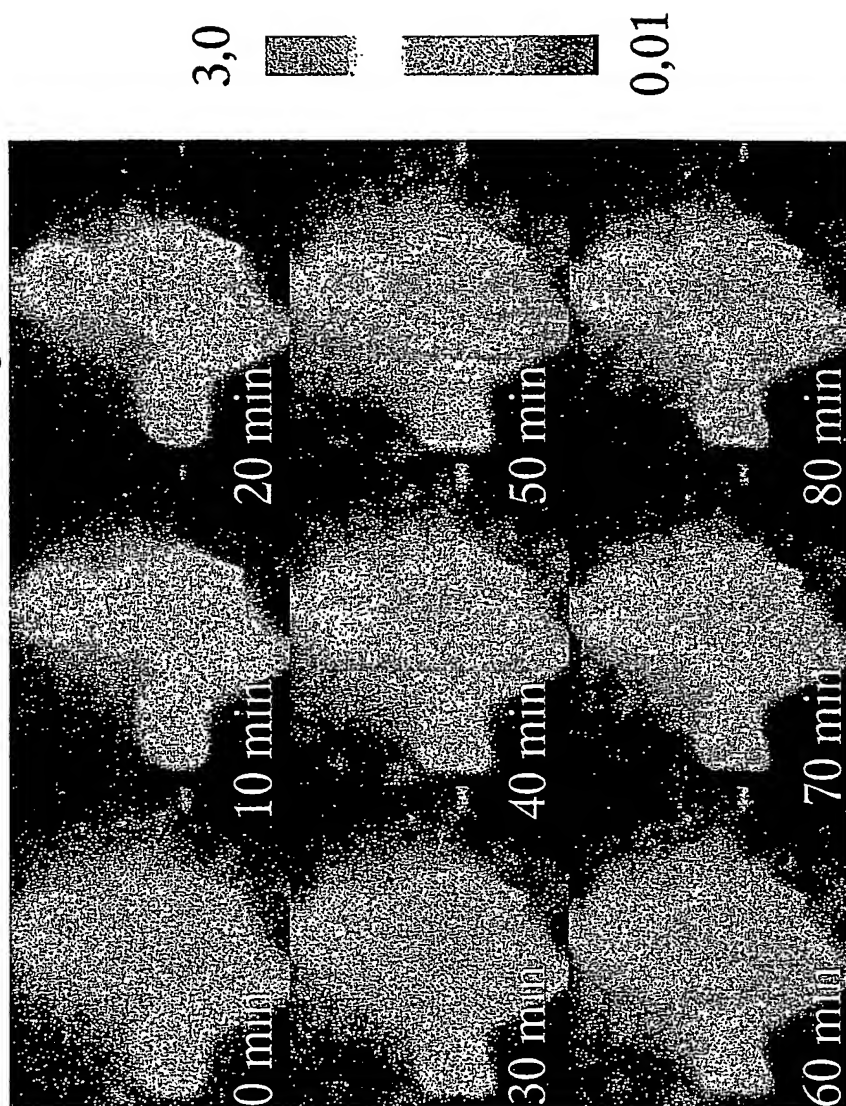
9/16

Fig. 6A: Inhibition der Interaktion von AKAP188-CFP und RII α -YFP durch das Peptid S-Ht31 - Abnahme des FRET-Signals



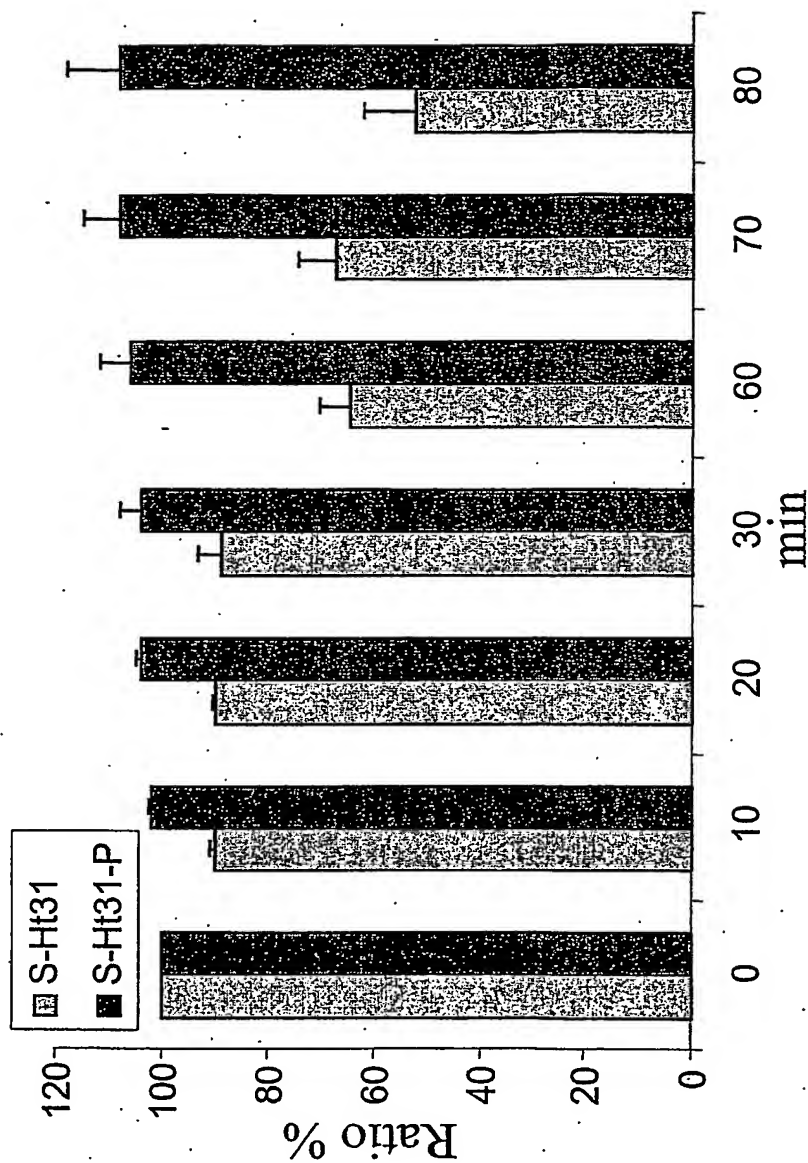
10/16

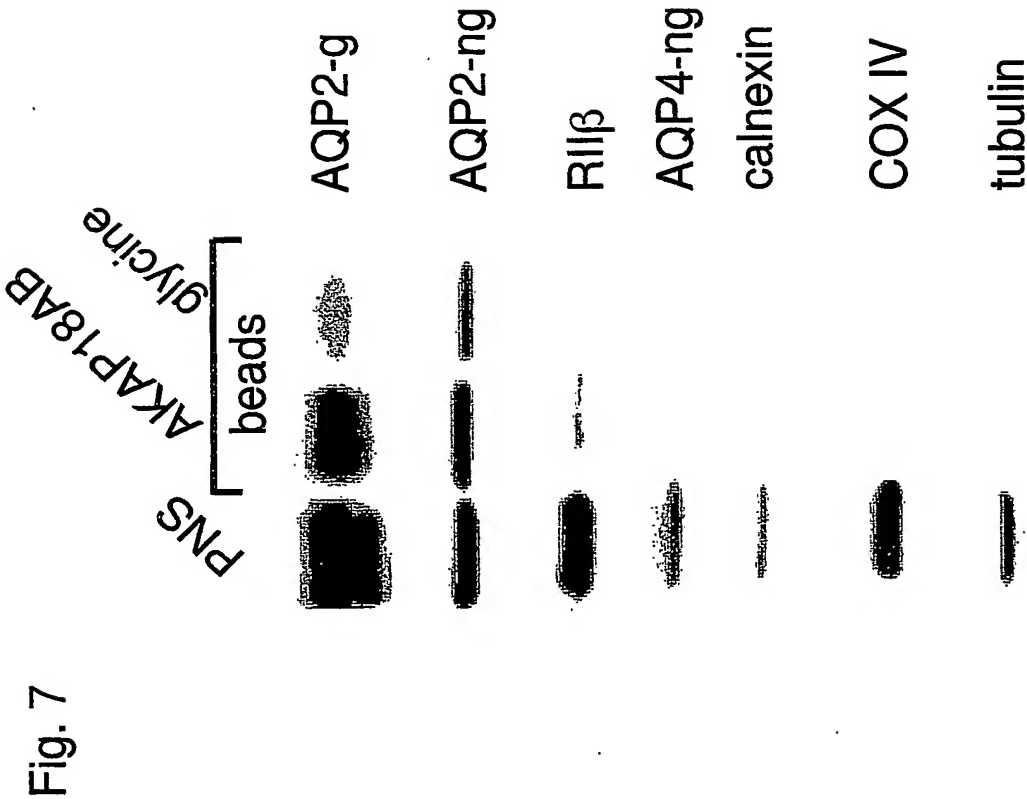
Fig. 6B: Das Peptid S-Ht31-P hemmt die Interaktion von
AKAP18 δ -CFP und RII α -YFP nicht
- keine Abnahme des FRET-Signals



11/16

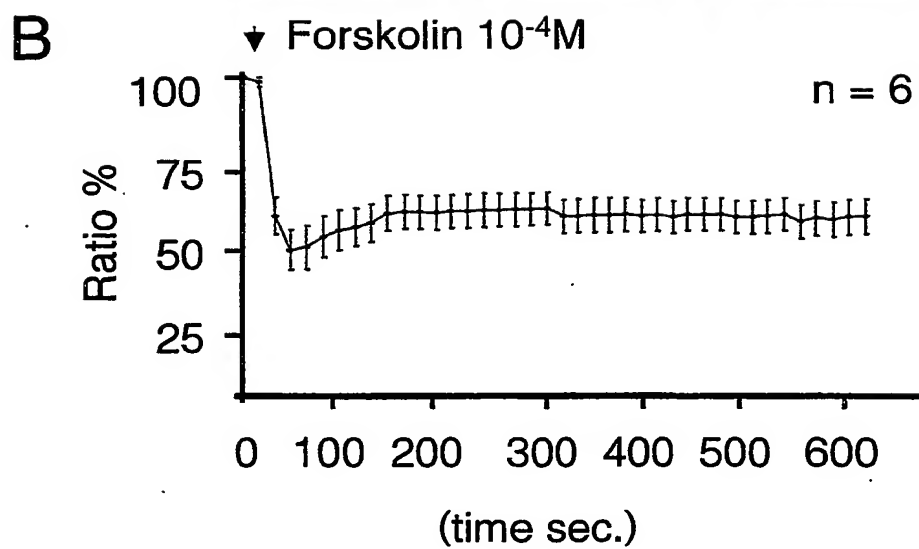
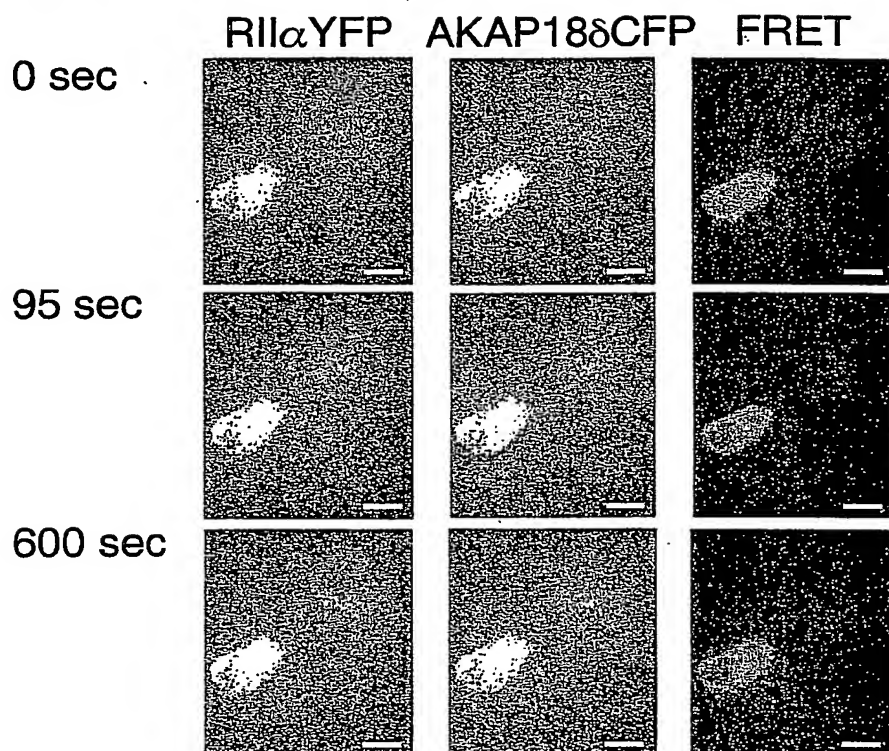
Fig. 6C: Veränderungen der FRET-Signale (Ratio 535/480) von AKAP18 δ -CFP und RI α -YFP in HEK293-Zellen in Gegenwart der Peptide S-Ht31 und S-Ht31-P





13/16

Fig. 8A



14/16

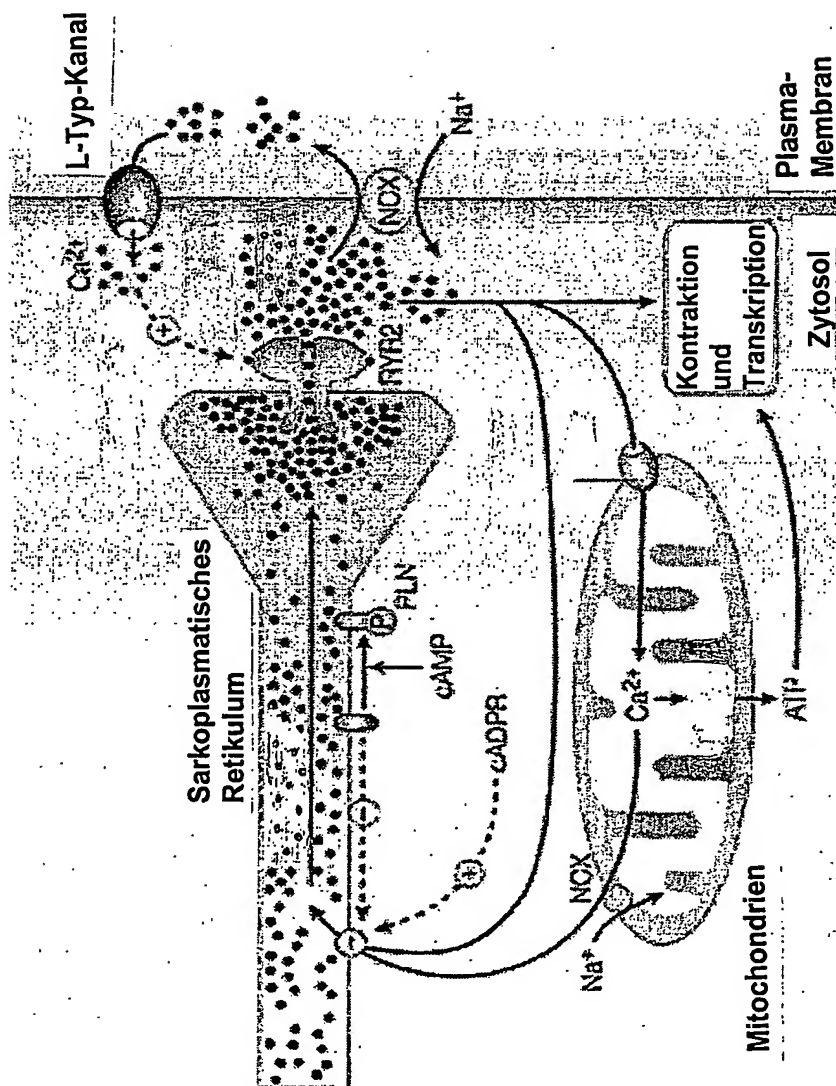
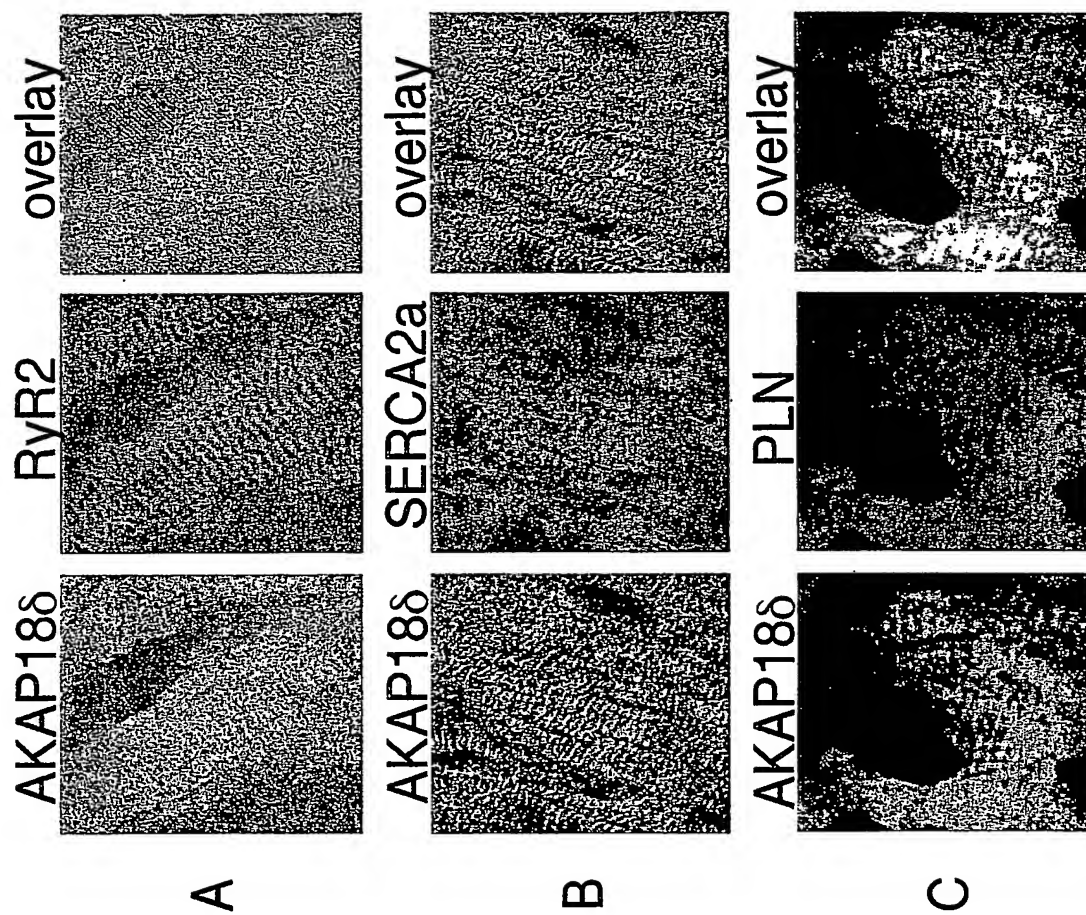
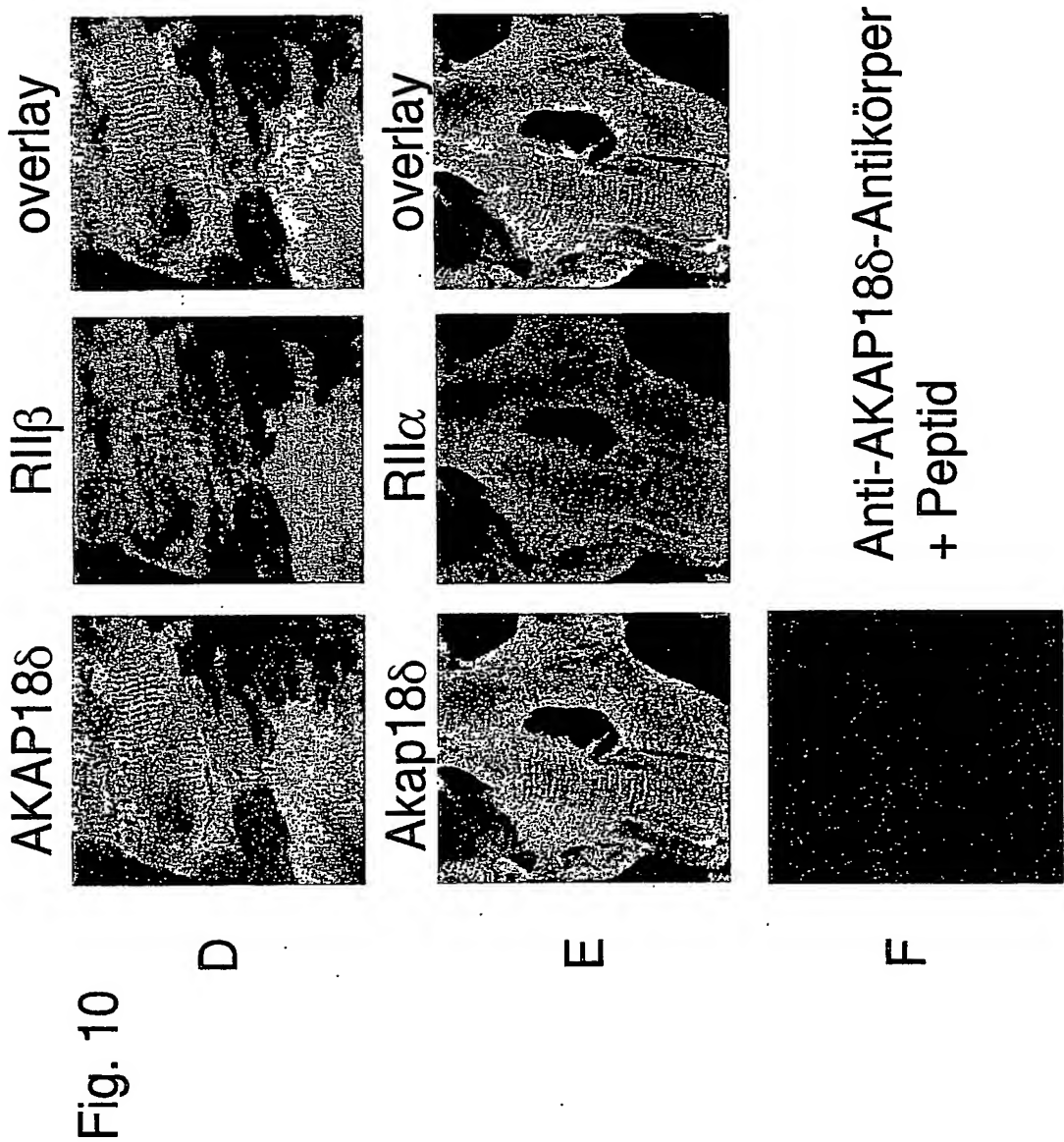


Fig. 9

15/16





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat PC	Application No 03/09892
----------------	----------------------------

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 A61K38/17 G01N21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KLUSSMANN E. ET AL.: "Characterization of a new splice variant of AKAP18: its potential involvement in vasopressin-mediated water reabsorption" NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, vol. 362, no. 4-5 (Supplement), 2000, page R28 XP009024324 the whole document ---	1-10,15
Y	KLUSSMANN E. AND ROSENTHAL W.: "Role and Identification of protein kinase A anchoring proteins in vasopressin mediated aquaporin-2 translocation" KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 60, 2001, pages 446-449, XP002267810 Seite 448, letzter Absatz page 447, paragraph 3; figure 1 --- -/--	1-10,15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 January 2004

Date of mailing of the international search report

18/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stolz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internationa

Application No

PC

03/09892

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TROTTER K.W. ET AL.: "Alternative splicing Regulates the subcellular localization of A-kinase anchoring protein 18 isoforms" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 147, no. 7, 27 December 1999 (1999-12-27), pages 1481-1492, XP002267811 cited in the application	7,8
Y	Seite 1483, Spalte 1, Absatz Western Blot page 1482, column 2, paragraphs 4,5; figures 1,2	1-6,9, 10,15
A	--- KLUSSMANN E. ET AL.: "Protein Kinase A anchoring proteins are required for Vasopressin-mediated Translocation of Aquaporin-2 into cell membranes of Renal principal cells" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 8, 19 February 1999 (1999-02-19), pages 4934-4938, XP002267812 cited in the application page 4937, last paragraph	1-10,15
P,A	--- OLIVERIA S.F. ET AL.: "Imaging kinase-AKAP79-phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 160, no. 1, 6 January 2003 (2003-01-06), pages 101-112, XP002267813 the whole document -----	11-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat : Aktenzeichen

PC 03/09892

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/47 C12N15/12 A61K38/17 G01N21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

SEQUENCE SEARCH, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	KLUSSMANN E. ET AL.: "Characterization of a new splice variant of AKAP18: its potential involvement in vasopressin-mediated water reabsorption" NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY, Bd. 362, Nr. 4-5 (Supplement), 2000, Seite R28 XP009024324 das ganze Dokument	1-10,15
Y	KLUSSMANN E. AND ROSENTHAL W.: "Role and Identification of protein kinase A anchoring proteins in vasopressin mediated aquaporin-2 translocation" KIDNEY INTERNATIONAL, Bd. 60, 2001, Seiten 446-449, XP002267810 Seite 448, letzter Absatz Seite 447, Absatz 3; Abbildung 1	1-10,15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Januar 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/02/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stolz, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internal : Aktenzeichen

PO 03/09892

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	TROTTER K.W. ET AL.: "Alternative splicing Regulates the subcellular localization of A-kinase anchoring protein 18 isoforms" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 147, Nr. 7, 27. Dezember 1999 (1999-12-27), Seiten 1481-1492, XP002267811 in der Anmeldung erwähnt	7,8
Y	Seite 1483, Spalte 1, Absatz Western Blot Seite 1482, Spalte 2, Absätze 4,5; Abbildungen 1,2	1-6,9, 10,15
A	--- KLUSSMANN E. ET AL.: "Protein Kinase A anchoring proteins are required for Vasopressin-mediated Translocation of Aquaporin-2 into cell membranes of Renal principal cells" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 274, Nr. 8, 19. Februar 1999 (1999-02-19), Seiten 4934-4938, XP002267812 in der Anmeldung erwähnt Seite 4937, letzter Absatz	1-10,15
P,A	--- OLIVERIA S.F. ET AL.: "Imaging kinase-AKAP79-phosphatase scaffold complexes at the plasma membrane in living cells using FRET microscopy" THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 160, Nr. 1, 6. Januar 2003 (2003-01-06), Seiten 101-112, XP002267813 das ganze Dokument -----	11-14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.